

**Untersuchungen zur Phagen-kontrollierten Synthese
der bakteriellen DNS
in transduzierenden Partikeln
des Salmonella-Phagen P22**

Horst Backhaus

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0036

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Untersuchungen zur Phagen-kontrollierten Synthese
der bakteriellen DNS in transduzierenden Partikeln
des Salmonella-Phagen P22

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität, München



vorgelegt von

Horst Backhaus

aus

Peine

1976

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
August 1972 bis Juni 1976 am Genetischen Institut
der Universität München unter der Anleitung von
Herrn Priv. Doz. Dr. Horst Schmieger durchgeführt.



1. Berichterstatter: Dr. Horst Schmieger

2. Berichterstatter: Dr. Karl Moritz

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 1976

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1-13
I. Viren als Objekte genetischer Forschung	1
II. Bakterien-DNS als Substrat Phagen-kontrollier- ter Reaktionen	5
B. MATERIAL UND METHODEN	14-27
I. Bakteriophagen	14
II. Bakterienstämme	14
III. Medien, Lösungen, Chemikalien	16
IV. Methoden	18
a) Übernachtkulturen	18
b) Bestimmen von Phagentitern	18
c) Transduktionen	18
d) Vermehrung von Phagen	19
e) Konzentrieren von Phagenlysaten über eine ECTEOLA-Säule	20
f) Konzentrieren und Reinigen von Phagen- lysaten im CsCl-Stufengradienten	20
g) Markieren von DNS	21
1. Markierte Phagenlysate	23
1.1 T-BU-Lysat	23
1.2 T-T-Lysat	23
1.3 BU-BU-Lysat	23
1.4 ^3H -T-BU-Lysat	24
2. Bestimmen der DNS-Syntheserate durch Kurz- zeitmarkierung mit Thymidin-6- ^3H	24
h) CsCl-Gradienten	25
1. Phagen	25

1.1 Darstellung der Dichteverteilungen in den Zeichnungen	26
2. DNS	27
i) Extraktion von Phagen-DNS	27
j) Alkalische Denaturierung von DNS	27
C. E R G E B N I S S E	28-97
I. Herkunft und Struktur des DNS-Moleküls einer kleinen Gruppe transduzierender Partikel von P22	28
II. Untersuchungen über die Beziehungen zwischen bakterieller und Phagen-kontrollierter DNS-Replikation	49
a) Hinweise auf geänderte Merkmale der DNS-Replikation nach Phageninfektion	49
b) Replikation von P22 in einer Mutante von Salmonella typhimurium mit einem temperatursensiblen Defekt in der Initiation der DNS-Replikation	57
1. Der Verlauf der DNS-Synthese in der Mutante TB 37 nach Infektion mit P22	60
2. Phagenreifung in der Mutante TB 37 bei 42°C	76
c) Nachweis einer Phagen-kontrollierten Replikation bakterieller DNS in der Bakterienmutante TB 37	81
D. D I S K U S S I O N	98-113
E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	114-130
F. Z U S A M M E N F A S S U N G	131-132

A. E I N L E I T U N G

I. Viren als Objekte genetischer Forschung

Die widerspruchsfreie Einordnung aller Merkmale des Lebendigen in das Schachtelsystem einander einschließender Naturgesetze ist heute eine in der biologischen Forschung allgemein akzeptierte Zielvorstellung. Dabei ist es die theoretische Aufgabe der Genetik, Ursachen und Mechanismen der "reproduktiven Invarianz" (Monod) zu klären. Der molekularen Genetik kommt deshalb eine zentrale Bedeutung in der modernen Biologie zu, weil es hier bisher am überzeugendsten gelungen ist, die Tatsachen der

- Bewahrung und Reproduktion genetischer Information,
- ihrer Veränderung durch Mutation und Rekombination,
- und ihrer phänotypischen Expression

kausal mit physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten zu verknüpfen.

Der wesentlichste Grund für diese Erfolge dürfte die Wahl von Untersuchungsobjekten relativ geringer Komplexität für Experiment und Modellbildung gewesen sein. Als solche haben sich seit einigen Jahrzehnten Bakterien und Viren bewährt, die neben der relativ geringen Zahl von Merkmalen noch einige andere für Fragestellungen der Genetik entscheidende Vorteile aufweisen:

- a) Ihre hohe Reproduktionsrate und mikroskopischen Dimensionen erlauben es, innerhalb kurzer Zeit große Nachkommenzahlen zu züchten; bei Anwendung selektiver Techniken werden dann auch seltene Erbänderungen leicht erfaßbar.

- b) In parasexuellen Prozessen erfolgt ein Austausch genetischer Information, der experimentell manipuliert werden kann.
- c) Durch die haploide Struktur des Genoms sind seine Veränderungen leicht in der Expression des Phänotyps beobachtbar.

In diesen Kriterien unterscheiden sich die Viren von den Bakterien durch die wesentlich geringere Komplexität und höhere Reproduktionsrate. Viren dienen als Versuchsobjekte in Experimenten, die die chemische Natur des Trägers genetischer Information bestimmten (Hershey und Chase, 1952), und mit ihrer Hilfe gelang die Entschlüsselung dieser Information als eines nicht überlappenden Triplett - Codes (Crick et al., 1961; Wittmann, 1962). Beispiele dieser Art ließen sich in beliebiger Zahl anführen, und tatsächlich haben gerade Arbeiten mit Viren als Untersuchungsobjekten und Modellsystemen entscheidend zu den Fortschritten molekulargenetischer Forschung beigetragen (Taylor, 1965; Cairns et al. ed., 1966).

Viren sind ausschließlich aus genetischem Material (DNS oder RNS) und einer mehr oder minder komplizierten Proteinhülle aufgebaut. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und können sich nur in den für sie spezifischen und stoffwechselaktiven Zellen vermehren. Viren, deren Wirtszellen Bakterien sind, werden Bakteriophagen genannt. Eine gebräuchliche Klassifizierung unterscheidet zwischen virulenten und temperenten Bakteriophagen. Bei virulenten Phagen (bekanntestes Beispiel sind die geradzahligen

T-Phagen von *Escherichia coli*) läuft nach Adsorption an Oberflächenstrukturen der Zelle und Injektion des genetischen Materials (Phageninfektion) in jedem Falle ein lytischer Zyklus ab. Die geregelte Synthese Phagen-codierter Proteine mit Hilfe des bakteriellen Stoffwechselsystems führt dabei zur Replikation der Phagen-Nukleinsäure und ihrer Verpackung in die Hüllproteine. Nach einer Latenzzeit von im typischen Falle 20 bis 40 Minuten lysiert die Zelle und gibt einen Phagenwurf von einigen hundert Partikeln frei. Bei temperenten Phagen (P22 von *Salmonella typhimurium*, P1 und Lambda von *Escherichia coli*) kann nach der Infektion ebenfalls ein lytischer Zyklus ablaufen. Die Infektion kann aber auch, durch das geregelte Abrufen der dafür notwendigen Gene, zur Lyso-genisierung der Zelle führen. Eine lysogenisierte Zelle trägt den "Prophagen", das ist die Phagen-DNS, entweder integriert in das Bakterienchromosom (P22, Lambda), oder als selbständig replizierte Ringstruktur (P1). Der Prophage wird während des Zellwachstums mit repliziert und bei Teilungen auf die Tochterzellen verteilt. Während dieses lysogenen Zyklus' werden nur wenige Prophagen-gene konstitutiv exprimiert. Sie können zur sogenannten Phagenkonversion führen (etwa Änderung von Oberflächen-Antigenen, Resistenz gegen andere Phagen (Uetake et al., 1958)), und sind für die Immunität der Zelle wie für die Aufrechterhaltung der Lysogenie verantwortlich. Spontan (in einer Häufigkeit von ca. 10^{-5} /Zellteilung) oder induziert z.B. durch die Bestrahlung mit UV oder Behand-

lung mit bestimmten Mutagenen kann dieses Kontrollsystem versagen. Dann geht der Prophage durch Exprimieren der vegetativen Phagenfunktionen in den lytischen Zyklus über, der zur Lyse der Zelle unter Freisetzen eines Phagenwurfes führt.

Diese kurze Beschreibung beider Phagengruppen mag einige der auch in dieser Arbeit angesprochenen Schwerpunkte des Interesses an der Erforschung dieser biologischen Objekte verständlich machen:

- Die Synthese von Phagenpartikeln kann als Beispiel für die Gesetzmäßigkeiten studiert werden, welche die geordnete Morphopoiese biologischer Strukturen steuern.
- Die Lysogenie ist ein Modellfall für die Koordinierung regulatorischer Funktionen. Ihr Studium scheint auch besonders deshalb von Bedeutung, weil viele der Beobachtungen an temperenten Bakteriophagen weitgehende Analogien zu Viren zeigen, welche im Verdacht stehen, krebserregend zu sein (Eckhart, 1972).
- Jede Phagen-Species hat, abhängig von Struktur und Komplexität ihres Genoms eine spezifische "Strategie der Infektion". So sind auch die Mechanismen unterschiedlich, die dem Phagen dazu verhelfen, die Kontrolle über die Makromolekülsynthese der Zelle zu übernehmen, sie quasi dazu zu "überreden", überwiegend Phagennachkommen zu produzieren. Im Zusammenhang damit steht die Frage, welche Funktionen der Zelle notwendig für die Phagenreplikation sind, und welche Genprodukte, neben den seine Struktur aufbau-

enden Proteinen, der Phage für seine eigene Synthese beisteuert.

Es ist sicher, daß die Untersuchung des Modellsystems Phage - Bakterium noch viele neue Einsichten in allgemeinere biologische Fragen fördern kann (Schweiger und Herrlich, 1975).

II. Bakterien-DNS als Substrat Phagen-kontrollierter Reaktionen

Nach der Infektion mit virulenten Phagen wird im typischen Falle das Wirtschromosom vollständig zu den Mononukleotiden abgebaut, die dann als Bausteine der Phagen-DNS-Synthese dienen können (Hershey et al., 1953). Dagegen bleibt nach Infektion mit temperenten Phagen im lysogenen Zyklus die Struktur des bakteriellen Informationsträgers weitgehend erhalten. In den meisten Fällen führt bei der Etablierung der Lysogenie ein spezieller, durch den Phagen gesteuerter Rekombinationsmechanismus zur Integration des Phagengenoms in das bakterielle Chromosom, entweder an einem genetisch fixierten Ort (Lambda, P22; Campbell, 1962; Smith und Levine, 1965b), oder auch an beliebigen Stellen des Chromosoms (Mu1; Martuscelli et al., 1971; Bukhari und Zipser, 1972). In lysogenisierten Zellen laufen Replikation und Expression der bakteriellen Information normal ab. Auch der lytische Zyklus temperenter Phagen nach lytischer Infektion oder Induktion lysogener Zellen führt nicht zum vollständigen Abbau des

Bakterienchromosoms wie bei virulenten Phagen (Schmieger, 1971a). Allerdings können Phagenpartikel solcher Lysate gelegentlich Teile der Bakterien-Information enthalten, die durch diese Partikel auch in andere Bakterien übertragen werden kann. Einen solchen Vorgang der Übertragung bakterieller Information von einer Zelle in eine andere, bei dem Viren als Vektoren auftreten, bezeichnet man als "Transduktion". Neben Transformation und Konjugation gehört er zu den parasexuellen Mechanismen, die die Rekombination bakterieller Genorte unterschiedlicher Herkunft ermöglichen. Zum erstenmal berichteten Zinder und Lederberg (1952) über einen solchen Vorgang beim Phagen PLT22 (heute P22 genannt) von *Salmonella typhimurium*. Es kann gezeigt werden, daß die Partikel, welche bakterielle Information übertragen (das sind transduzierende Partikel: t.P.), in ihren äußeren Eigenschaften, also der Struktur ihrer Proteinhülle, sich nicht von den Bakteriophagen (den infektiösen oder plaquebildenden Partikeln: i.P.) unterscheiden (Zinder, 1955).

Üblicherweise wird bei der Transduktion eine Einteilung in zwei Hauptkategorien vorgenommen. In Abhängigkeit von den zu übertragenden Chromosomenabschnitten unterscheidet man die spezielle von der allgemeinen Transduktion. Bei der speziellen Transduktion werden nur wenige, ganz bestimmte Marker (Genorte) übertragen. Ein typisches Beispiel ist die Übertragung der gal-Loci (Gene des Galaktose-Abbaus) durch den Phagen Lambda von *E. coli* K 12 (Morse et al., 1956). Campbells Modell für die

lineare Integration des Phagengenoms in das Wirtschromosom und seine Ausgliederung (excision) bei der Induktion des Prophagen beschreibt anschaulich, wie die Struktur der DNS dieser transduzierenden Partikel zustandekommt (Campbell, 1962). Hier ist ein Teil des Phagengenoms durch - dem Ort der Prophageninsertion benachbarte - Bakteriengene ersetzt, und die Rekombination des Phagengenoms mit dem Bakterienchromosom ist Voraussetzung für die Entstehung transduzierender Partikel. Weil solch ein transduzierendes Partikel gewöhnlich nur einen Teil des Phagengenoms trägt, ist es in seinen Phagenfunktionen defekt und hat seine Fähigkeit verloren, einen Plaque zu bilden.

Auch die allgemein transduzierenden Partikel des Salmonella-Phagen P22, die alle Genorte des Bakterienchromosoms übertragen können, sind defekt: sie können die Empfängerzelle nicht lysogenisieren (Starlinger, 1958). Man kann die DNS des Bakterienchromosoms und/oder die nach Phageninfektion synthetisierte DNS mit ^{32}P markieren. Dann zeigt ein Vergleich der - durch den Zerfall des Radiophosphors verursachten - Inaktivierungsraten von t.P. und i.P. in P22-Lysaten, daß mindestens ein Teil der DNS transduzierender Partikel originale (vor dem Zeitpunkt der Phageninfektion vorhandene) Bakterien-DNS ist (Starlinger, 1959). In anderen Experimenten konnte durch Trennung ganzer Partikel oder ihrer DNS in CsCl-Dichtegradienten gezeigt werden, daß die DNS allgemein transduzierender Partikel ausschließlich

oder fast ausschließlich aus Bakterien-DNS besteht, die zum Zeitpunkt der Phageninfektion schon synthetisiert war (Okubo et al., 1963; Ikeda und Tomizawa, 1965; Schmieger 1968, 1970; Ebel-Tsipis et al., 1972).

Die einfachste Modellvorstellung für die Entstehung allgemein transduzierender Partikel sieht eine Analogie zum Vorgang des sogenannten "phenotypic mixing" (Delbrück und Bailey, 1946; Stocker, 1958). Delbrück und Bailey konnten nachweisen, daß bei gleichzeitiger Infektion einer E.coli-Zelle durch die nahe miteinander verwandten virulenten Phagen T2 und T4 im resultierenden Phagenwurf Partikel nachzuweisen sind, bei denen in Proteinhüllen von T2 und T4 die genetische Information des jeweils anderen Phagen nachzuweisen ist. Das "wrapping choice"-Modell der Entstehung allgemein transduzierender Partikel postuliert nun, daß es als Unfall bei der normalen Phagenreifung passieren kann, daß in Phagenpartikel nicht die spezifische Phagen-DNS, sondern ein entsprechend großes Teilstück des Bakterienchromosoms verpackt wird (Ozeki und Ikeda, 1968).

Das einheitliche Molekulargewicht der DNS-Moleküle in Bakteriophagen mit zirkulär permutiertem Genom (P1, T4, P22) wird in eleganter und vielfach bestätigter Weise durch das Modell des sogenannten "head-full"-Mechanismus von Streisinger erklärt (Streisinger et al., 1967). Nach diesem Mechanismus treten während der Phagenreplikation überlange Strukturen mehrfach hintereinander geschalteter Phagen Genome auf, von denen die jeweils durch die Kapazität der Phagenhülle bestimmte Einheitslänge verpackt wird. Auch das DNS-Molekül transduzierender Partikel hat Einheitsgesamtlänge (Ikeda und Tomizawa, 1965; Schmieger, 1970). Sein Reifungsprozeß scheint ähnlichen Gesetzmäßigkeiten zu unterliegen, wie besonders gut an Varianten von P1 gezeigt werden kann, die bei geringerem Partikelvolumen weniger Bakterien-DNS enthalten (Ikeda und Tomizawa, 1965b).

In Sucrose-Gradienten läßt sich unter bestimmten Bedingungen die Fragmentierung des Bakterienchromosoms zu Bruchstücken von Phagen-spezifischer Länge als Folge der Infektion mit P22 nachweisen (Schmieger und Buch, 1975).

Allgemein transduzierende Partikel enthalten also je ein Fragment aus allen Bereichen des Bakterienchromosoms. Dieses Fragment wird nach Adsorption des Partikels an eine Empfängerzelle wie Phagen-DNS injiziert und kann durch Rekombination mit dem homologen Abschnitt des Empfängerchromosoms zum Austausch bakterieller genetischer Information führen. Diese Merkmale ließen die Transduktion auch zu einer wichtigen Methode der Bakteriengenetik werden. Man kann mit der Transduktion Bakterienstämme bestimmter genetischer Konstitution konstruieren und der Rekombinationsvorgang in der Empfängerzelle erlaubt eine Feinkartierung von Genorten auf dem gesamten Bakterienchromosom (Sanderson, 1972). Weil transduzierende Fragmente zufällige Ausschnitte des Bakterienchromosoms darstellen, läßt sich durch geeignete Markierung des Spender-Chromosoms während unterschiedlicher Zeiten im Replikationszyklus eine Aussage über die zeitliche Folge der Replikation bestimmter Chromosomenregionen gewinnen. So konnte durch die Analyse allgemein transduzierender Partikel der sequentielle Modus der DNS-Replikation nachgewiesen und der Startpunkt dieser Replikation auf dem Bakterienchromosom bestimmt werden (Caro und Berg, 1968; Nishioka und Eisenstark, 1970).

Nun fand Schmieger in T-BU-Lysaten (Dichtemarkierung der nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion synthetisierten DNS mit 5-Bromdesoxyuridin, siehe Mat. und Meth.) eine Dichtezunahme auch bei t.P. (Schmieger, 1968). Analysen der DNS transduzierender Partikel in Dichtegradienten führten ihn zur Postulierung seines Modells der DNS allgemein transduzierender Partikel bei P22, in dem ca. 90% (vor Phageninfektion synthetisierter) Bakterien-DNS kovalent mit einem kleinen Stück (etwa 10%) neusynthetisierter Phagen-DNS verbunden sind (Schmieger, 1970). Dieses Modell setzt einen Rekombinationsprozeß zwischen Phagen- und Bakterien-DNS vor der Bildung allgemein transduzierender Partikel voraus, und drängt deshalb Analogien zu speziell transduzierenden Partikeln auf. Es gibt bei P22 noch andere Hinweise darauf, daß die Modellvorstellung des "wrapping choice", nach der vor der Phageninfektion vorhandene bakterielle DNS zufällig in Phagenhüllen verpackt wird, so einfach nicht zutreffend sein kann. Es gelingt nämlich die Isolierung von Phagenmutanten, deren Lysate drastisch unterschiedliche Anteile an t.P. enthalten (Schmieger, 1971b, 1972). Die genetische Analyse zeigt, daß es mehrere Phagengene gibt, die die Effizienz des Vorgangs der Bildung transduzierender Partikel beeinflussen (Raj et al., 1974). Allerdings konnte für keines der aufgefundenen "Transduktionsgene" eine Beteiligung an Rekombinationsvorgängen wahrscheinlich gemacht werden, wie das nach dem o.a. Analogieschluß hätte vermutet werden dürfen. Es ist im

Augenblick schwierig, ein befriedigendes Modell für die Entstehung allgemein transduzierender Partikel von P22 vorzuschlagen, das alle experimentellen Befunde widerspruchsfrei erklärte.

Schon früh beschrieb Schmieger eine kleine Gruppe transduzierender Partikel, die er "schwere t.P." nannte, weil sie in T-BU-Lysaten ca. 70% des Dichtezuwachses der infektiösen Partikel aufwies (Schmieger, 1968). Die Frage nach Zusammensetzung und Entstehung des DNS-Moleküls dieser Gruppe transduzierender Partikel war Ausgangspunkt dieser Arbeit. Dabei interessierte zunächst der Mechanismus der Bildung dieser Partikel und die mögliche Stützung des "Rekombinationsmodells" für die DNS allgemein transduzierender Partikel. Für das DNS-Molekül dieser Gruppe läßt sich nämlich eine Rekombinationsstruktur postulieren, in der etwa 40% originale Bakterien-DNS mit einem entsprechend höheren Anteil an neusynthetisierter Phagen-DNS kovalent verbunden sind. Auch beim Phagen Lambda enthalten ja die speziell transduzierenden Partikel unterschiedliche Anteile an bakterieller DNS (Adler und Templeton, 1963). In meiner Diplomarbeit konnte ich allerdings den Nachweis führen, daß diese t.P. den gleichen Anteil bakterieller Information enthalten, wie die Hauptgruppe. Dieser Befund und die Entdeckung einer dritten Klasse transduzierender Partikel ergaben dann Hinweise auf eine Replikation bakterieller DNS unter der Kontrolle des Phagen.

Über den Einfluß einer Phageninfektion auf die Chromosomenreplikation der Bakterien ist wenig bekannt. Aus den Analysen von t.P. und anderen Experimenten muß geschlossen werden, daß nach Infektion mit temperenten Phagen der bakterielle Replikationsvorgang unterbrochen wird (Ikeda und Tomizawa, 1965; Smith und Levine, 1965; Botstein, 1968; Levine und Schott, 1971). In einigen Fällen wurde allerdings die Replikation genetischer Information der Wirtszelle unter der Kontrolle eines Phagen nachgewiesen. So scheinen bestimmte Plasmide (R-Faktoren, Col E2-Plasmid) nach Infektion mit P1 oder P22 extensiv repliziert zu werden (Ikeda und Tomizawa, 1965; Ozeki und Ikeda, 1968). Beim Phagen Mu-1 treten nach Infektion replikative DNS-Strukturen auf, die unterschiedliche Anteile an bakterieller und Phagenspezifischer DNS enthalten (Schroeder et al., 1974). Störungen der bakteriellen Replikation durch Mutationen können in bestimmten Fällen durch Phagen supprimiert werden. Dabei kann ein einrekombiniertes Phagengenom die Steuerung der Chromosomenreplikation übernehmen in einem Vorgang, den man als integrative Suppression bezeichnet (Nishimura et al., 1971; Lindahl et al., 1971), oder der Phage synthetisiert ein Protein, dessen Funktion dem im Wirtsbakterium ausgefallenen, und für die Replikation essentiellen Protein analog ist (Beyersmann und Schuster, 1971; D'Ari et al., 1975).

Ich habe im weiteren Verlauf meiner Arbeit die Beziehungen zwischen bakterieller Chromosomenreplikation und Phagen-gesteuerter DNS-Synthese bei *Salmonella typhimurium*

und P22 näher untersucht, wobei die Analyse von t.P.
als Nachweismethode der Replikation bakterieller DNS
diente.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Bakteriophagen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Kurzbeschreibung</u>
H1	P22 <u>c</u> ⁺ , Wildtyp
H5	P22 <u>c2</u> , Klarplaquemutante (Repressor defekt)
HT 12/4	NG- (N-methyl-N'-nitro-N-Nitroso-guanidin-) induzierte Mutante von H5 mit erhöhter Transduktionshäufigkeit (Schmieger, 1971b)

II. Bakterienstämme

<u>Kurzbezeichnung</u>	<u>Genotyp, Kurzbeschreibung</u>
LT-2	Salmonella typhimurium, Wildtyp
T 4/2	NG-induzierte Mutante von LT-2, auxotroph für Thymin/Thymidin
HIS	<u>his B22</u> , auxotroph für Histidin
TB 37	<u>dna A</u> , <u>thy 1152</u> , <u>his 3594</u> Mutante mit temperatursensiblen Defekt in der Initiation der DNS-Replikation, auxotroph für Thymin/Thymidin und Histidin (Bagdasarian et al., 1972)

TB 98	<u>met F185</u> , <u>thy 1152</u> auxotroph für Methionin und Thymin/Thymidin
3007	<u>pol A</u> , <u>ara B9</u> Defekt in der DNS-Polymerase I kein Arabinose-Abbau (Whitfield und Levine, 1973)
3008	<u>ara B9</u>
HIS (P22)	<u>his B22</u> auxotroph für Histidin
SA 4 (P22)	<u>leu A124</u> , <u>ara B9</u> auxotroph für Leucin, kein Arabi- nose-Abbau
SA 5 (P22)	<u>leu C126</u> , <u>ara B9</u>
SA 624 (P22)	<u>cys E1709</u> , <u>pyr E125</u> , <u>xyl E</u> auxotroph für Cystein und Pyrimidin, kein Xylose- Abbau
SU 687 (P22)	<u>trp A52</u> , <u>cys B12</u> , <u>pyr F146</u> auxotroph für Tryptophan, Cystein und Pyrimidin

Alle P22-lysogenen Stämme dienten in Transduktions-
experimenten als Empfänger. Das Symbol des Prophagen
steht in Klammern nach der Stammbezeichnung. Herkunft
der Stämme mit mehrfachen Auxotrophien: Dr. K. E.San-
derson.

III. Medien, Lösungen, Chemikalien

a) NB-Medium

8g Bacto-Nutrient-Broth

5g NaCl

1000 ml H₂O, entionisiert

b) NB-Platten

NB-Medium + 1,5% Agar

c) Weichagar

NB-Medium + 0,7% Agar

d) M9- (Minimal-) Platten

15,0g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

3,0g KH₂PO₄

0,5g NaCl

1,0g NH₄Cl

15,0g Difco-Agar

980ml entionisiertes Wasser

Nach Autoklavieren Zugabe von:

10 ml Glukose-Lösung (20%) oder Arabinose-Lösung (20%)

10 ml MgSO₄-Lösung (0,1M)

Nach Bedarf werden zugesetzt:

Endkonzentration:

L-Leucin 20 µg/ml

L-Tryptophan 20 µg/ml

L-Cystein 100 µg/ml

Uridin 50 µg/ml

e) Verdünnungsflüssigkeit

1g Trypton (Difco)

5g NaCl

1000 ml entionisiertes Wasser

f) TCG-Medium (Kozinski und Szybalski, 1959)

1,0 ml Lösung von Difco-casamino acids (vitamin free)
(5%)

2,0 ml Glukose-Lösung (20%)

0,2 ml NaCl-Lösung (25%)

0,16 ml Na_2SO_4 -Lösung (0,1 M)

0,32 ml KH_2PO_4 -Lösung (0,1 M)

0,1 ml MgSO_4 -Lösung (0,1 M)

0,14 ml CaCl_2 -Lösung (1,0 M)

0,03 ml FeCl_3 -Lösung (0,01 M)

100 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (0,1 M)

Supplementierung mit Nukleosiden nach Bedarf (siehe unter Methoden).

g) Tris-HCl-Puffer pH 7,4

Lösung von Tris- (hydroxymethyl-) Aminomethan (1 M)
mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

h) M9-Puffer

15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

3 g KH_2PO_4

5 g NaCl

1 ml MgSO_4 (1 M)

1000 ml H_2O , entionisiert

i) Scintillations-Flüssigkeit

5 g PPO, 0,3 g dimethyl-POPOP

1000 ml Toluol

j) Chemikalien

5-Bromdesoxyuridin, Thymidin, Desoxyadenosin (Fluka, Heidelberg); Thymidin-6- ^3H , 5000 mCi/mmol (Amersham-Buchler, Braunschweig); PPO, dimethyl-POPOP, Instagel (Packard, Frankfurt); Sarkosyl NL 30 (Geigy, Basel)

IV. Methoden

a) Übernachtskulturen

5 ml NB-Medium werden mit 0,05 ml Stammkultur angeimpft. Nach 15 bis 17 Stunden im Rollbebrüter haben die Kulturen eine Dichte von ca. 2×10^9 Zellen/ml.

b) Bestimmen von Phagentitern

In 2,5 ml flüssigem Weichagar (45°C) wird ein Tropfen einer frischen Übernachtskultur von LT-2 mit 0,1 ml einer geeigneten Phagenverdünnung durchmischt und der Weichagar gleichmäßig auf einer NB-Platte verteilt. Nach Bebrüten bei 37°C über Nacht können die durch die Vermehrung jeweils eines biologisch aktiven Phagen entstehenden Plaques (Löcher im trüben Bakterienrasen) ausgezählt werden.

c) Transduktionen

Wenn Transduktionen mit Klarplaquemutanten (c-Mutanten, die unfähig sind, die Bakterienzelle zu lysogenieren) des Phagen P22 durchgeführt werden sollen, muß die Lyse transduzierter Zellen durch intakte Phagen verhindert werden. Wegen der Einfachheit der Methode und der guten Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse verwenden wir grundsätzlich lysogene Empfängerzellen. Dabei wird die Lyse durch die Immunitätsreaktion verhindert. (Der durch den Prophagen konstitutiv synthetisierte Repressor reprimiert die Expression der Genome überinfizierender homoimmuner Phagen).

Durchführung:

Im Transduktionsansatz wird ein Aliquot einer frischen Übernachtskultur des Empfängerstammes mit Phagenlysats gemischt. Das Mischungsverhältnis wird so gewählt, daß

die Infektionsmultiplizität nicht über 10 liegt ($\text{moi} \leq 10$ Phagen/Zelle). Bis zu dieser moi ist die Zahl transduzierter Zellen direkt proportional zur Phagenkonzentration. Nach 10 Minuten Adsorptionszeit bei 37°C ohne Belüftung wird das Transduktionsgemisch in Eis gestellt und direkt, oder aus einer geeigneten Verdünnung in NB-Medium (damit alle transduzierten Zellen ähnliche Anfangsbedingungen auf der Platte haben) auf selektive Minimalplatten plattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C können die Kolonien transduzierter Zellen ausgezählt werden.

d) Vermehrung von Phagen

Eine frische Übernachtskultur wird 1:1000 in NB-Medium verdünnt. Die Zellen werden bei 37°C unter Durchströmen von Luft vermehrt, bis die Kultur eine Dichte von ca. 2×10^8 Zellen/ml erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt wird die Kultur mit Phagen infiziert. Bei c-Mutanten von P22 kann eine hohe Infektionsmultiplizität gewählt werden ($\text{moi} = 10$). Dann werden nach einem Vermehrungszyklus des Phagen alle Zellen lysiert. Bei Vermehrung des Wildtyps soll die Infektionsmultiplizität klein sein ($\text{moi} \leq 0,1$), um die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit möglichst gering zu halten. Diese hängt im Wesentlichen von der moi und dem physiologischen Zustand der Zellen ab. Die Inkubation wird unter gleichen Bedingungen fortgesetzt, bis eine Klärung der Kultur durch vollständige Lyse der Bakterien erfolgt - höchstens aber für zwei Stunden. Dann wird Chloroform zugesetzt und die Kultur weiter mit Luft durchströmt, bis das Chloroform entfernt ist. Chloroform tötet und öffnet noch nicht lysierte Zellen, schadet aber den Phagen nicht.

Nach Abzentrifugieren der Bakterienrückstände (15 Min. bei 5000 U/Min.) wird der Überstand, in dem sich die Phagen befinden, vorsichtig abgegossen. Das so gewonnene Rohlysate kann in zwei weiteren Schritten konzentriert und gereinigt werden.

e) Konzentrieren von Phagenlysaten über eine ECTEOLA-Säule

Eine Säule mit Cellex E (Bio-Rad, Richmond, Calif.) wird mit 1 M NaOH-Lösung equilibriert und mit entionisiertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Das Rohlysate wird auf die Säule gegeben, wobei u.a. die Phagen an die Austauscherzellulose adsorbieren. Anschließend können die Phagen mit 0,3 M NaCl-Lösung eluiert werden.

f) Konzentrieren und Reinigen von Phagenlysaten im CsCl-Stufengradienten

Im 30 ml-Zentrifugenröhrchen werden 5 ml CsCl-Lösung einer Dichte von $1,6 \text{ g/cm}^3$ vorsichtig mit 7 ml einer Lösung von $1,4 \text{ g/cm}^3$ überschichtet. Darüber wird das Phagenlysate geschichtet. Die Zentrifugation (in der präparativen Ultrazentrifuge L2 von Beckman) erfolgt im SW 25-Schwingbecherrotor bei 5°C und 23 000 U/Min. ($= 75\,000 \times g$)⁺. Nach 90 Minuten kann die Zentrifugation beendet werden. Die Phagen, die eine Dichte von ca. $1,50 \text{ g/cm}^3$ haben, befinden sich dann in einer Bande zwischen den CsCl-Lösungen und können durch eine Kanüle, mit der der Boden des Röhrchens durchbohrt wird, geerntet werden. Das CsCl wird durch Dialyse gegen 0,001 M Tris-Puffer pH 7,4 entfernt.

⁺) alle Angaben von Schwerkrafteinheiten beziehen sich auf die am Boden des Röhrchens bei der angegebenen Umdrehungszahl herrschenden Kräfte.

Auf die beschriebene Weise können Rohlysate oder über die Säule gewonnene Phagenkonzentrate rasch von Bakterien- oder Medienrückständen sowie von Verunreinigungen mit Ecteola befreit werden. Insbesondere enthalten diese Phagenpräparationen keine Rückstände bakterieller Proteine oder Nukleinsäuren (Schmieger, 1970)

g) Markieren von DNS

DNS läßt sich selektiv durch die Base Thymin, deren Analoga wie 5-Bromuracil oder die entsprechenden Nukleoside markieren. Bakterienzellen verfügen über Stoffwechselwege, die diese Vorstufen über die Nukleotide direkt in die DNS-Synthesereaktionen einschleusen. Nun nehmen Wildtypzellen von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* im Medium angebotenes Thymin praktisch gar nicht und das Nukleosid nur für sehr kurze Zeit auf (Kammen, 1967; Khandekar und Ramanand, 1972). Dafür scheint im Wesentlichen die Lage des Reaktionsgleichgewichts einer durch das induzierbare Enzym Thymidin-Phosphorylase katalysierten Reaktion verantwortlich. Dieses Gleichgewicht ist bei Wildtypzellen durch den Mangel an endogener Desoxyribose bestimmt (O'Donovan und Neuhard, 1970). Durch einen Überschuß an Purin-Desoxyribonukleosiden kann der Einbau von Thymin und Thymidin stark stimuliert werden. Dabei liefert die Reaktion einer für die Purin-Nukleoside spezifischen Phosphorylase das für die Thymidin-Synthese notwendige d-Ribose-1-P. Das Thymidin wird dann in einer durch die Thymidin-Kinase katalysierten Reaktion zum Thymidilat phosphoryliert (Abb. 1).

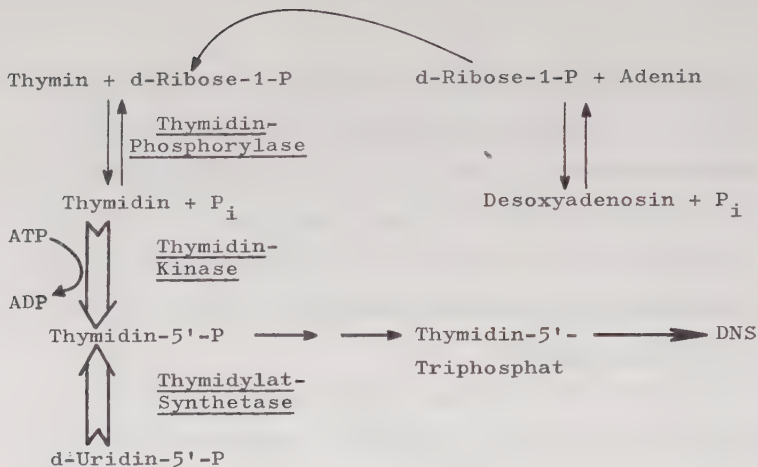


Abbildung 1

Reaktionen für die Synthese von Thymidin-5'-Triphosphat

Andere Möglichkeiten, die Aufnahme und den Einbau von Thymidin/Thymin zu erreichen, sind die spezifische Hemmung der Thymidylat-Synthetase-Reaktion zum Beispiel durch Aminopterin (Stahl et al., 1961, Schmieger, 1968), oder die Verwendung von Bakterienmutanten, die diese Reaktion nicht mehr katalysieren können. Die in den zu beschreibenden Experimenten eingesetzten Mutanten zeigen eine reproduzierbar gute Einbaurrate von Thymidin und 5-BUdR und benötigen zum Wachstum nur die geringe Konzentration von $2\mu\text{g/ml}$ (Hewitt et al., 1967; Schmieger, 1970).

5-Bromdesoxyuridin (5-BUdR) wird in den oben beschriebenen Reaktionen wie Thymidin umgesetzt. Als Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat kann es bei der DNS-Replikation mit den natürlichen Nukleotiden um die Basenpaarung konkurrieren. 5-BUdR wirkt mutagen (Freese, 1959) und verleiht der DNS, in die es als Thymidin-Analog eingebaut ist, eine

höhere Dichte. Der Dichtezuwachs hängt von dem Anteil an substituiertem Thymin ab.

1. Markierte Phagenlysate

1.1 T-BU-Lysat

TCG-20 (TCG-Medium mit 20 μg Thymidin/ml) wird 1:100 aus einer im gleichen Medium gewachsenen Übernachtskultur von T 4/2 angeimpft. Die Zellen werden unter Belüftung bei 37°C vermehrt, bis eine Dichte von ca. 3×10^8 Zellen/ml erreicht ist (mikroskopische Auszählung). Dann wird die Kultur mit Phagen ($\text{moi} = 5$) infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 3 Minuten ohne Belüftung werden die Zellen sofort auf Membranfiltern (Schleicher&Schüll, BA 85/1) gesammelt, mit dem gleichen Volumen TCG-Medium gewaschen, und in TCG-Medium mit

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thymidin

5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-Bromdesoxyuridin

250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Desoxyadenosin

resuspendiert. 80 Minuten lang wird die Kultur weiter bei 37°C mit Luft durchströmt. Nach Zugabe von Chloroform werden die Bakterienrückstände abzentrifugiert.

1.2 T-T-Lysat

Dieses Lysat wird auf die gleiche Weise wie das T-BU-Lysat gewonnen. Aber die nach 3 Minuten Adsorptionszeit für die Phagen auf Membranfiltern gesammelten und gewaschenen Zellen werden anschließend wieder in TCG-20 resuspendiert. (Keine Dichtemarkierung von DNS)

1.3 BU-BU-Lysat

T 4/2-Zellen, die in TCG-20 bis zu einer Dichte von 2×10^8 Zellen/ml gewachsen sind, werden abzentrifugiert

und in TCG-Medium (ohne Thymidin) resuspendiert. Mit dieser Suspension wird BU-Medium so angeimpft, daß die Kultur einen Ausgangstiter von 2×10^7 Zellen/ml hat. Nach Wachstum der Kultur (bei 37°C und Belüftung) bis zu einem Titer von 2×10^8 Zellen/ml wird infiziert und das Lysat in der gleichen Weise gezogen, wie für das T-BU-Lysat beschrieben.

1.4 ^3H -T-BU-Lysat

T 4/2 wird in TCG-Medium mit

2 $\mu\text{g/ml}$ Thymidin
250 $\mu\text{g/ml}$ Desoxyadenosin
10 $\mu\text{Ci/ml}$ Thymidin-6- ^3H (spez. Akt.: 5000 mCi/mmol)

bis zu einer Dichte von 2×10^8 Zellen/ml gezogen. Dann werden die Zellen abzentrifugiert und im gleichen Volumen TCG-200 (200 μg Thymidin/ml) resuspendiert. Nach 30 Minuten Belüftung bei 37°C , die dazu dienen, alle Radioaktivität in den Zellen zu binden oder zu verdünnen, wird mit HT 12/4 ($\text{moi} = 5$) infiziert. Die anschließende Prozedur ist die gleiche wie beim T-BU-Lysat. Das ^3H -T-BU-Lysat muß in einem CsCl -Stufengradienten von der darin enthaltenen freien ^3H -DNS der lysierten Zellen gereinigt werden.

2. Bestimmen der DNS-Syntheserate durch Kurzzeitmarkierung

mit Thymidin-6- ^3H

Einer unter Belüftung in TCG-2 (2 μg Thymidin/ml) wachsender Bakterienkultur werden in Zeitabständen Proben von 200 μl entnommen und schnell zu 100 μl des Markierungsmediums (TCG + 20 μCi Thymidin-6- ^3H /ml) gemischt. Nach 2 Minuten in der Versuchstemperatur wird der Einbau des radioaktiven Thymidins durch Zugabe von 5 ml eiskalter Trichloressigsäure mit 0,5 g/ml Thymidin gestoppt. Die Proben

bleiben für mindestens eine Stunde im Eisbad. Dann wird die in fällbarem Material (DNS) gebundene Radioaktivität auf vorgewaschenen Membranfiltern (Schleicher&Schüll BA 85, 0,45 μm) gesammelt und mit 10 ml eiskalten entionisierten Wassers nachgewaschen. Die Radioaktivität auf den bei 65°C getrockneten Filtern wird im üblichen Toluol-Scintillator gemessen. Diese Prozedur folgt weitgehend den von Dopatka und Prell (1973) beschriebenen Modifikationen der von Smith und Levine (1968) angewandten Methode.

h) CsCl-Dichtegradienten

1. Phagen

In 4 ml Phagenlysate werden 3,1 g CsCl gelöst, sodaß die Dichte der Lösung bei 1,49 g/cm^3 liegt. Alle Dichtemessungen werden im Refraktometer bei Na-Licht und 25°C durchgeführt. Die Berechnung der Dichte erfolgt nach der Formel:

$$\rho^{25^\circ} = 10,8601 \times n_D^{25^\circ} - 13,4974 \quad (\text{g/cm}^3)$$

$n_D^{25^\circ}$: Brechungsindex bei 25°C und Na-Licht (D-Linie) (Vinograd, 1963)

Die Zentrifugation wird im Schwenkbecherrotor für 22 bis 24 Stunden bei 5°C in der präparativen Ultrazentrifuge durchgeführt. Kleinere Mengen (bis ca. 4,5 ml) können im SW 39 oder SW 50.1-Rotor bei 27 000 U/Min. (=80 000 x g) zentrifugiert werden, bei größeren Lysatmengen (bis ca. 30ml) wird der SW 27-Rotor bei 25 000 U/Min. (= 110 000 x g) verwendet. Aus dem am Boden angebohrten Röhrchen werden etwa 80 bis 100 Fraktionen in Röhrchen mit einer Vorlage von 0,5 - 1,0 ml M9-Puffer oder NB-Medium getropft. Jedes 10. Röhrchen enthält keine Vorlage. Diese Fraktionen dienen der Dichtebestimmung. Nach der Fraktionierung werden die Röhrchen mit jeweils einem Tropfen Chloroform sterilisiert.

Abweichungen im Verfahren und Besonderheiten der einzelnen Gradienten werden an anderer Stelle beschrieben.

1.1 Darstellung der Dichteverteilung in den Zeichnungen

Als Dichtereferenz wurde in allen Gradienten eine ausreichende Menge an H1-Phagen (gezogen auf HIS) mitzentrifugiert. Aus Dichtebestimmungen in 5 Gradienten (die untereinander um ca. $\pm 0,0015 \text{ g/cm}^3$ schwankten, u.a. in Abhängigkeit von Medienbestandteilen im Gradienten, die den Brechungsindex verändern) wurde für den H1 eine mittlere Dichte von $1,507 \text{ g/cm}^3$ bestimmt. In allen Zeichnungen wurden die Fraktionen nun so auf der Abszisse verschoben, daß das Maximum der Referenzphagenverteilung stets bei dieser Dichte lag. Außerdem wurden in der Darstellung die Fraktionsabstände in der Weise gestaucht oder gespreizt, daß gleich großen Dichtedifferenzen gleich große Abstände auf der Abszisse entsprachen. (Dichtedifferenzen sind reproduzierbar: der über den Brechungsindex gemessene Dichteunterschied zwischen den Verteilungsgipfeln zweier Partikelarten ist in verschiedenen Gradienten gleich groß) Auf der Ordinate ist der Prozentanteil der Summe der im Gradienten titrierten Partikelarten aufgetragen. Generell repräsentieren die Punkte in den Verteilungen der transduzierenden Partikel die wirklichen Titer mit höherer Genauigkeit, als jene der infektiösen Partikel. Der Hauptgrund dafür mag in der größeren Anzahl an Verdünnungsschritten liegen, die für die Titrierung der infektiösen Partikel notwendig sind.

2. DNS

Für neutrale DNS-Gradienten wird die Anfangsdichte mit CsCl auf $1,690 \text{ g/cm}^3$ eingestellt, für alkalische (Einzelstrang-) Gradienten mit CsCl und $0,1 \text{ M NaOH}$ auf $1,730 \text{ g/cm}^3$. Die Zentrifugation erfolgt in 12 ml-Polyallomer-Röhrchen im 50 Ti-Festwinkelrotor bei 32 000 U/Min. (= 95 000 x g). Nach 48 Stunden bei 5°C werden 3 Tropfen-Fractionen vom Boden des Röhrchens auf Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll Nr. 9) aufgetropft. Die Filter werden getrocknet, für eine Stunde in eiskalter Trichloressigsäure (10%) behandelt und 15 Minuten in Aceton gewaschen. Die gefällte Radioaktivität auf den getrockneten Filtern wird im üblichen Toluol-Scintillator gemessen.

i) Extraktion von Phagen-DNS

Zu den Partikelfractionen wird das Detergens Sarkosyl NL 30 (Geigy) gegeben (Endkonzentration 1%). Die DNS wird durch 20 Minuten Inkubation bei 65°C extrahiert.

j) Alkalische Denaturierung von DNS

erfolgt durch Inkubation mit Na_3PO_4 (Endkonzentration $0,1 \text{ M}$, pH 12,3) für 40 Minuten bei 25°C .

C. E R G E B N I S S E

I. Herkunft und Struktur des DNS-Moleküls einer kleinen Gruppe transduzierender Partikel von P22

Die unterschiedliche Markierung der vor dem Zeitpunkt der Infektion replizierten Bakterien-DNS und der nach Phageninfektion synthetisierten DNS ist ein einfacher methodischer Ansatz, um die Frage nach der Herkunft der DNS allgemein transduzierender Partikel zu beantworten (Starlinger, 1959). Im CsCl-Dichtegradienten können Phagenpartikel getrennt und charakterisiert werden, die unterschiedliche Anteile an dichtemarkierter DNS enthalten (Meselson und Weigle, 1961). Diese Methoden führten bei Untersuchungen am Escherichia coli-Phagen P1 und dem Phagen P22 von Salmonella typhimurium zu der Aussage, daß die allgemein transduzierenden Partikel dieser Phagen ausschließlich oder fast ausschließlich bakterielle DNS enthalten, die vor dem Zeitpunkt der Phageninfektion synthetisiert wurde (Ikeda und Tomizawa, 1965; Ebel-Tsipis et al., 1972).

Die in Wildtyplysaten von P22 am häufigsten vertretene Klasse transduzierender Partikel, welche den Marker his B überträgt, hat in unmarkierten Lysaten exakt die Dichte der infektiösen Partikel (i.P.). Untersucht man die Verteilung dieser transduzierenden Partikel (t.P.) eines T-BU-Lysates (siehe Mat. u. Meth.) im CsCl-Gradienten, so beobachtet man für die Hauptfraktion eine geringe, aber reproduzierbare Dichteverschiebung gegenüber dem Referenzphagen (Schmieger, 1968). Dieser Befund war Ausgangspunkt einer

genauen Analyse der DNS dieser Partikel und der Formulierung des Rekombinationsmodells der transduzierenden DNS bei P22, nach dem ca. 90% vor Phageninfektion vorhandener Bakterien-DNS mit 10% neusynthetisierter Phagen-DNS kovalent verknüpft sind (Schmieger, 1970).

Durch eine Schulter im dichteren Bereich der Verteilung der his^+ -t.P. in Gradienten von T-BU-Lysaten gibt sich eine kleine Fraktion an Partikeln zu erkennen, für die durch eine zweite Zentrifugation gezeigt werden kann, daß es sich um eine diskrete Gruppe transduzierender Partikel handelt. Diese Gruppe "schwerer t.P." weist eine Dichte zwischen der unmarkierten Referenz und den vollständig markierten i.P. dieser Lysate auf und umfaßt nur einen Anteil von weniger als 10% der Gesamtmenge an t.P. (Schmieger, 1968). Diese Tatsache setzte ihrer weiteren Untersuchung technische Grenzen, die erst nach Isolierung der HT-Mutanten überwunden werden konnten. HT-Mutanten enthalten eine um Zehnerpotenzen höhere Anzahl an t.P. im Lysat (Schmieger, 1971b, 1972). Die genauere Analyse zeigt eine gute Übereinstimmung biologischer und physikalischer Parameter zwischen Mutante und Wildtyp. Alle Beobachtungen sprechen dafür, daß der Prozeß der Bildung transduzierender Partikel bei Wildtyp und HT-Mutanten im Wesentlichen der gleiche ist (Schmieger und Backhaus, 1973; Schmieger und Buch, 1975). In T-BU-Lysaten dieser Mutanten kann die Gruppe "schwerer t.P." in der gleichen Weise nachgewiesen werden wie beim Wildtyp, und weil ihr relativer Anteil an der Gesamtmenge an t.P. etwa ebenso groß ist, kommen diese

t.P. im HT-Lysat in größerer Häufigkeit vor, als die Gesamtmenge der t.P. im Wildtyplysat. Damit wird ihre Analyse ermöglicht. Alle Untersuchungen dieser Arbeit sind daher an Lysaten der Mutante HT 12/4 durchgeführt. Damit sind die Rückschlüsse auf die Partikel des Wildtyps mit der gleichen Unsicherheit behaftet, wie die Ableitung der Übereinstimmung des Prozesses der Partikelbildung aus der Identität der untersuchten biologischen und physikalischen Parameter bei Mutante und Wildtyp.

In meiner Diplomarbeit habe ich mögliche Hypothesen über die Struktur der DNS der Gruppe "schwerer t.P." auf ihre Gültigkeit hin untersucht. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, daß die höhere Dichte dieser Partikel nicht aus einer geänderten Relation zwischen Protein- und DNS-Gehalt resultiert, wie es für einige Partikelvarianten, etwa bei P1 und T4 beschrieben wurde (Ikeda und Tomizawa, 1965b; Mosig et al., 1972). Die "schweren t.P." sind nur in T-BU-Lysaten nachweisbar. Sie enthalten also, bei gleicher DNS-Menge im Partikel, einen größeren Anteil an DNS, die nach Phageninfektion synthetisiert und damit dichtemarkiert wurde. Dieser Anteil an neusynthetisierter DNS könnte aus Phagen-DNS bestehen: diese Hypothese ergibt sich aus Analogiebetrachtungen zur Struktur der DNS der Hauptgruppe allgemein transduzierender Partikel bei P22, die 90% vor der Infektion synthetisierter bakterieller DNS und 10% neusynthetisierter Phagen-DNS enthält. Eine ähnliche Situation liegt auch in der Struktur der speziell transduzierenden Partikel des Phagen Lambda vor, die von Fall zu Fall

variable Anteile bakterieller DNS - kovalent an unterschiedlich reduzierte Phagengenome gebunden - enthalten (Adler und Templeton, 1963). In der postulierten Struktur wären bei Einheitsgesamtlänge mehr als 50% Phagen-DNS mit einem entsprechend verringerten Anteil an bakterieller DNS verbunden.

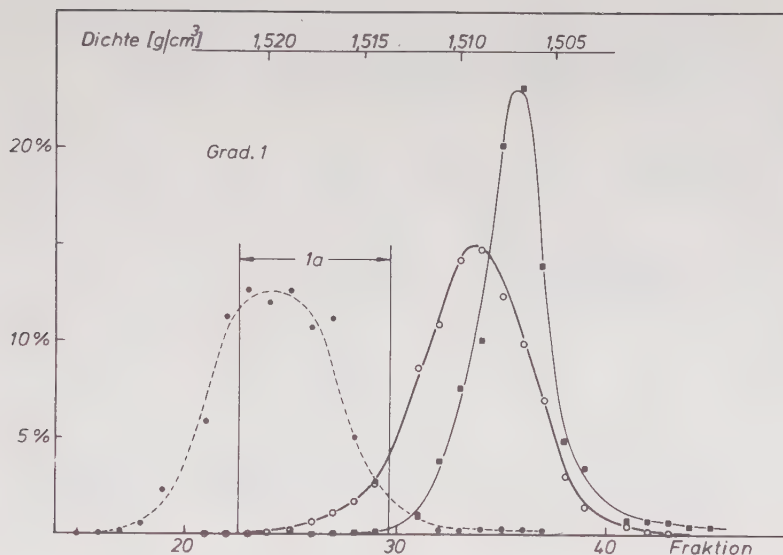
Um diese Hypothese zu prüfen, wurde versucht, eine Verringerung des Anteils bakterieller Information in der Struktur nachzuweisen. Eine einfache und ausreichend empfindliche Meßgröße für den Anteil bakterieller Information ist die Cotransduktion: zwei bakterielle Marker können dann und nur dann gemeinsam in einem t.P. übertragen werden, wenn ihr Abstand auf dem Genom des Spenderbakteriums geringer ist, als die Länge der bakteriellen DNS im t.P. (Ikeda und Tomizawa, 1965b)⁺). Verringerungen der Cotransduktionsfrequenz sollten mit einer aus dem CsCl-Gradienten gewonnenen Präparation "schwerer t.P." im Vergleich mit einem kompletten Lysat leicht nachzuweisen sein. (Die Cotransduktionshäufigkeit eines kompletten HT 12/4-Lysats ist wegen der weit überwiegenden Anzahl an normalen t.P. im Lysat ein Maß für die Menge bakterieller Information nur in der Hauptgruppe transduzierender Partikel.)

⁺) Weil die Häufigkeit der Cotransduktion auch von den Rekombinationsereignissen im Empfängerbakterium abhängt, würden auch gemeinsam von einem kürzeren Fragment übertragene Marker mit deutlich geringerer Häufigkeit cotransduziert, als die gleichen Marker auf einem Fragment doppelter Länge (Dawson, 1963). Eine Doppeltransduktion zweier Marker durch Fragmente aus verschiedenen Partikeln kann sich nur so selten ereignen, daß sie das Versuchsergebnis hier nicht beeinflußt.

In Figur 1 und 2 ist die Analyse eines T-BU-Lysates von HT 12/4 im CsCl-Gradienten und die Abtrennung der Gruppe "schwerer t.P." demonstriert (S. 33 u. 34). Um eine ausreichende Menge an "schweren t.P." zu gewinnen, wurden 11 ml eines T-BU-Lysates von HT 12/4 im 30 ml-Schwingbecherrotor zentrifugiert (weitere Details der Gradienten siehe Legenden zu den Figuren). Figur 1 zeigt die Verteilung der his^+ -t.P. in diesem Gradienten (1). Das Maximum ihrer Verteilung liegt bei einer Dichte von $1,509 \text{ g/cm}^3$ und ist damit um etwa $0,002 \text{ g/cm}^3$ gegenüber der Dichte des Referenzphagen (H1, Wildtyp von P22) verschoben. Diese t.P. haben in unmarkierten Lysaten von HT 12/4 die gleiche Dichte wie die i.P.. Die i.P. dieses T-BU-Lysates bilden ihren Verteilungsgipfel bei einer Dichte von $1,520 \text{ g/cm}^3$. Nach Fox und Meselson (1963) würde vollständiges Ersetzen des Thymins durch Bromuracil beim Phagen Lambda zu einem Dichtezuwachs von $0,032 \text{ g/cm}^3$ führen. Weil die P22-DNS den gleichen G+C-Gehalt von 47% aufweist (Skalka und Hanson, 1972; Schildkraut et al., 1962), läßt sich aus dem Dichtezuwachs der i.P. des T-BU-Lysates von $0,013 \text{ g/cm}^3$ berechnen, daß in ihrer DNS etwa 40% aller Thyminbasen durch Bromuracil ersetzt sind. Höhere Substitutionsraten sind erreichbar (Schmieger, 1968; siehe auch Abschnitt IIc), aber die beobachtete Markierung reicht aus, Partikel mit unterschiedlichen Anteilen an dichtemarkierter DNS zu trennen.

Im dichteren Bereich der Verteilung der his^+ - t.P. in diesem Gradienten ist eine Diskontinuität der Verteilung als Schulter zu erkennen.

(Weiter S. 36)

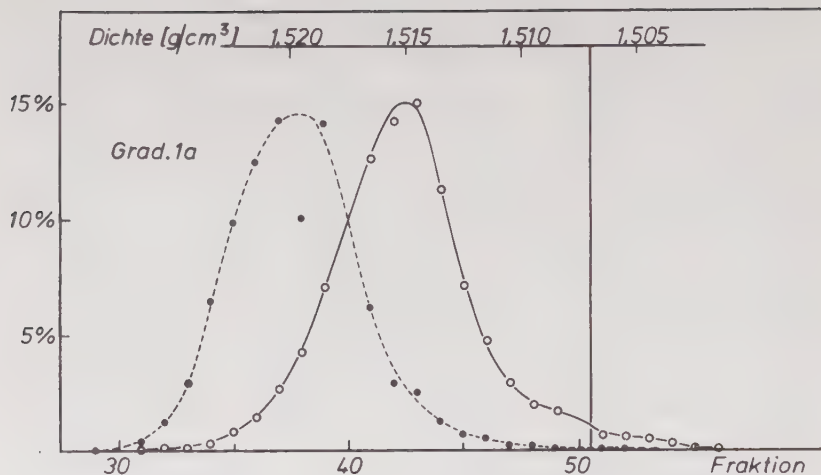


Figur 1: Gradient 1

Verteilung der i.P. und his⁺- t.P. eines T-BU-Lysates von HT 12/4 in den Fraktionen eines 30 ml-Gradienten. Hier ist auch die Verteilung der i.P. des als Dichtereferenz mit-zentrifugierten Wildtypphagen H1 dargestellt. Die Lage des Gipfelpunktes dieser Verteilung wird in allen folgenden Figuren durch eine senkrechte Linie bei der Dichte von 1,507 g/cm³ markiert. Der Gradient hatte 97 Fraktionen. (Zur Darstellung der Dichteverteilungen siehe Mat.u.Meth.)

Die im folgenden Gradienten zentrifugierten Fraktionen sind durch $\longleftrightarrow 1a \longrightarrow$ gekennzeichnet.

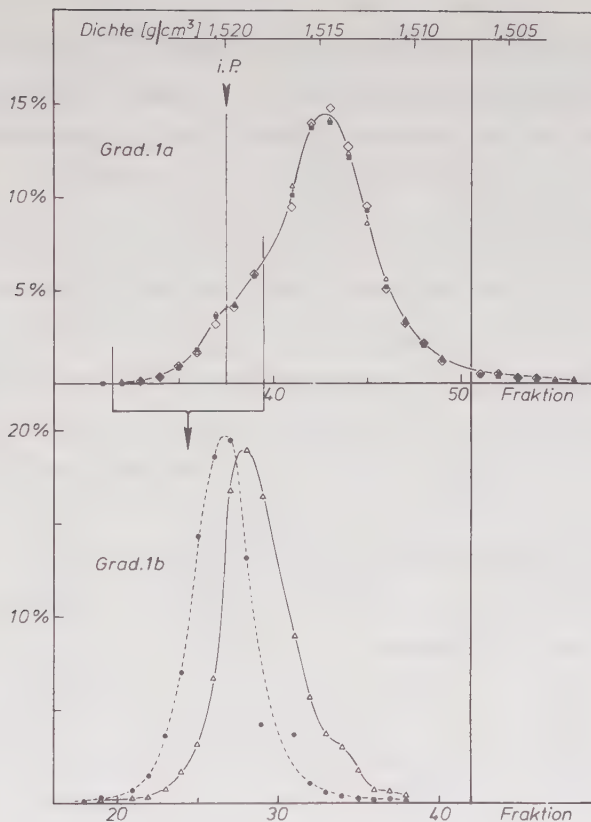
--●---●---●--- i.P.(HT 12/4); -○---○---○- his⁺-t.P.
 —■—■—■— i.P.(H1)



Figur 2: Gradient 1a

Verteilung der i.P. und der his⁺-t.P. in einem 3,5 ml-Gradienten der in Tafel 1 gekennzeichneten Fraktionen. Der Gipfelpunkt der Verteilung des Referenzphagen H1 ist als senkrechte Linie bei 1,507 g/cm³ dargestellt. (92 Fraktionen)

---●--- i.P.; —○— his⁺-t.P.



Figur 3: Gradient 1a, Gradient 1b

Gradient 1a: Verteilung der t.P. für den Empfängerstamm SA 5(P22). Das Verteilungsmaximum der i.P. ist markiert, ebenso die für den Gradienten 1b zusammengefaßten Fraktionen.

Gradient 1b: Verteilung der i.P. und der ara⁺-t.P. (Empfänger SA 5 (P22)) der oben gekennzeichneten Fraktionen in einem weiteren 3,5 ml-Gradienten (86 Fraktionen).

In beiden Gradienten symbolisiert die senkrechte Linie bei 1,507 g/cm³ die Position der Dichtereferenz (H1).

—△—△—△— ara⁺-t.P.; —■—■—■— leu⁺-t.P.
—◇—◇—◇— ara⁺-leu⁺-t.P.; -●-●-●- i.P.

Diese Fraktionen enthalten die sogenannten "schweren t.P.", welche durch Zusammenfassen dieser Fraktionen und erneute Zentrifugation im CsCl-Gradienten abgetrennt und eindeutig als diskrete Gruppe identifiziert werden können.

Figur 2 zeigt die Verteilung der his^+ -t.P. in diesem Gradienten (1a). Der Gipfelpunkt der Verteilung liegt bei $1,515 \text{ g/cm}^3$. Die Diskontinuität im leichteren Bereich kann durch einen kleinen Anteil an normalen t.P. erklärt werden. Der Dichteunterschied zu den vollständig markierten i.P. ($1,507 \text{ g/cm}^3$) zeigt an, daß etwa 60% der DNS dieser Gruppe transduzierender Partikel dichtemarkiert sind. Aus dem Vergleich der Gesamtanzahlen an t.P. in diesem und dem ersten Gradienten ergibt sich, daß knapp 10% der t.P. der Gruppe "schwerer t.P." angehören.

Die "schweren t.P." dieses Gradienten wurden auf ihre Cotransduktionshäufigkeit hin untersucht. Diese Versuche führten an drei verschiedenen Empfängerstämmen mit unterschiedlichen cotransduzierbaren Markern übereinstimmend zu der Aussage:

Für die "schweren t.P. des Gradienten 1a stimmen in allen Fraktionen innerhalb der Fehlergrenzen die gefundenen Cotransduktionshäufigkeiten mit den aus einem kompletten Lysat in den Vorversuchen ermittelten Häufigkeiten überein.

Die identische Verteilung der t.P. für Einzelmarker und Cotransduktion im Gradienten ist eine gute Stützung der Annahme, daß die Partikel in allen Dichtebereichen von gleicher genetischer Struktur sind. Als Beispiel ist in

Figur 3 die Verteilung der ara^+ -t.P., der leu^+ -t.P. und der $\text{ara}^+ \text{leu}^+$ -t.P. (Empfängerstamm SA 5 (P22)) wiedergegeben. Es gibt also keinen Hinweis darauf, daß sich der Anteil bakterieller Information (DNS) in den "schweren t.P." signifikant von dem der Hauptgruppe unterscheidet.

Nach diesen Ergebnissen mußte gefolgert werden, daß ein Anteil der bakteriellen DNS in "schweren t.P." nach dem Zeitpunkt der Infektion synthetisiert und dichtemarkiert wurde. Die auffällige Schulter im dichten Bereich der Verteilung der "schweren t.P." im Gradienten 1a (siehe Fig.3) deuteten die Existenz einer dritten Gruppe transduzierender Partikel mit vollständig nach Phageninfektion synthetisierter bakterieller DNS an. Die (in Fig.3, Grad. 1a gekennzeichneten) Fraktionen dieses Dichtebereichs wurden wieder zusammengefaßt und die Partikel in einem weiteren 3,5 ml-Gradienten analysiert. Figur 3 zeigt die Verteilung der ara^+ -t.P. und der i.P. in diesem Gradienten (1b). Hier bilden die ara^+ -t.P. ihren Verteilungsgipfel bei einer Dichte von $1,519 \text{ g/cm}^3$. Es gibt also in T-BU-Lysaten auch eine Gruppe "superschwerer t.P.", die fast die gleiche Dichte erreicht, wie die vollständig markierten i.P. dieses Lysats.

Aus diesen Dichtegradientenanalysen der t.P. eines T-BU-Lysats können einfache Modellvorstellungen über die Struktur der DNS-Moleküle der Gruppen transduzierender Partikel abgeleitet werden:

- Wenn in der Hauptgruppe allgemein transduzierender Partikel bei P22 ein Molekül vorliegt, in dem ein kleiner Anteil neusynthetisierter Phagen-DNS mit etwa 90% vor

Phageninfektion vorhandener originaler Bakterien-DNS verbunden ist, dann ist

- bei der Klasse der "schweren t.P." gerade ein Strang der bakteriellen DNS nach Phageninfektion semikonservativ repliziert (und im T-BU-Lysat durch Bromuracil dichtemarkiert). Deshalb nehmen die "schweren" his^+ -t.P. ($1,515 \text{ g/cm}^3$) gerade eine Dichte zwischen der Hauptgruppe dieser Partikel im T-BU-Lysat ($1,509 \text{ g/cm}^3$) und den vollständig markierten i.P. ($1,520 \text{ g/cm}^3$) ein. Auch die Dichtezunahme der "schweren" ara^+ -t.P. ($1,515 \text{ g/cm}^3$) gegenüber der Hauptgruppe ($1,511 \text{ g/cm}^3$, ohne Abb.) ist halb so groß wie die der vollständig markierten Partikel der dritten Gruppe. Die Klasse "schwerer t.P." enthält etwa 10% der Gesamtmenge an t.P..
- In der dritten Gruppe "superschwerer t.P." (die bei den ara^+ -t.P. etwa 2% der Gesamtmenge umfaßt) wurde die bakterielle DNS komplett nach Phageninfektion synthetisiert und dichtemarkiert.

In Abbildung 2 (S. 39) sind die Modellvorstellungen für die DNS dieser Partikel veranschaulicht.

Dichtedifferenzen, die zwischen den Hauptgruppen transduzierender Partikel zu beobachten sind (his^+ -t.P. $1,509 \text{ g/cm}^3$, ara^+ -t.P. $1,511 \text{ g/cm}^3$) wurden schon früh für t.P. unterschiedlicher Marker beschrieben (Sheppard, 1962; Roth und Hartman, 1965). Sie kommen durch unterschiedliche G+C-Anteile in den einzelnen Abschnitten des Bakterienchromosoms zustande (Yamagishi, 1970; 1971). Die Salmonella-DNS hat einen höheren mittleren G+C-Anteil (53%) als P22-DNS (47%)

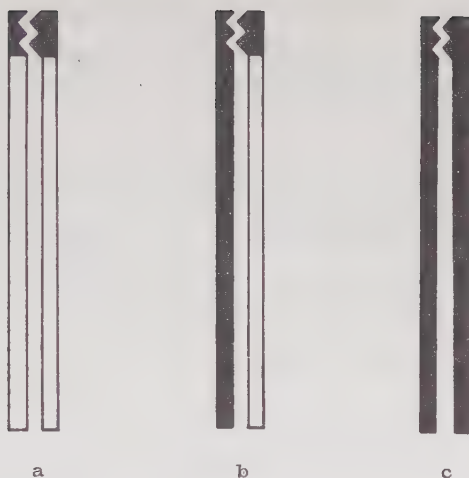


Abbildung 2

Modelle für die DNS-Moleküle der Gruppen allgemein transduzierender Partikel von P22

a: Hauptgruppe; b: "schwere t.P."; c: "superschwere t.P."

-  : Bakterien-DNS, vor Infektionszeitpunkt vorhanden
-  : Bakterien-DNS, nach Infektionszeitpunkt synthetisiert (BU-markiert im T-BU-Lysat)
-  : Phagen-DNS (BU-markiert)

(Schildkraut et al., 1962; Skalka und Hanson, 1972). Aus diesem Grunde hat die Mehrzahl aller t.P. bei HT 12/4 eine höhere Dichte als die i.P.. - Die Dichtemarkierung muß - auch bei gleichbleibender Substitutionsrate - für Partikel mit einem höheren G+C-Anteil im DNS-Molekül zu einem geringeren Dichtezuwachs führen, weil in ihrer bakteriellen DNS weniger Thyminbasen für die Substitution durch Bromuracil zur Verfügung stehen. Dieser Effekt allein reicht allerdings

nicht aus, die beobachtete Dichtedifferenz zwischen den "superschweren ara⁺-t.P." (1,519 g/cm³) und den vollständig markierten i. P. (1,520 g/cm³, siehe Fig.3) zu erklären. Es ist offensichtlich so, daß bei der Replikation der Bakterien-DNS mit höherem G+C-Anteil auch prozentual weniger Thyminbasen substituiert werden können, als in der A+T-reicheren der i.P. (und his⁺- t.P.)⁺. Ikeda und Tomizawa beschrieben ähnliche Beobachtungen, die sie bei der Untersuchung der allgemein transduzierenden Partikel des Escherichia coli-Phagen P1 machten (1965a). - Auch die hier diskutierten Einschränkungen erlauben aber die Feststellung, daß die Dichten der "schweren" und "superschweren" t.P. eine ähnliche BU-Substitutionsrate (Anteil durch Bromuracil ersetzter Thyminbasen) in der bakteriellen DNS anzeigen, wie sie bei der Phagen-DNS der i.P. vorliegt. (Im folgenden Abschnitt II kann nämlich gezeigt werden, daß bei der normalen bakteriellen DNS-Replikation diese Rate signifikant geringer ist.)

⁺) Mit bekannten Parametern läßt sich die Abhängigkeit des Dichtezuwachses von P22-Partikeln von G+C-Anteil der DNS und Bromuracil-Substitutionsrate in einer einfachen Gleichung zusammenfassen. Bei P22 macht die DNS etwa 50% der Partikelmasse aus. Damit folgt für die Abhängigkeit der Partikeldichte von G+C-Anteil der DNS (mit den Angaben von Schildkraut et al. (1962) und der Dichtebestimmung von 1,507 g/cm³ für die i.P. mit einem mittleren molaren G+C-Anteil von 0,47):

$$\rho = \frac{0,098 \text{ (GC)}}{2} + 1,484 \text{ (g/cm}^3\text{)} \quad \text{(GC): molarer G+C-Anteil}$$

Der Dichtezuwachs wegen Substitution von Thymin durch Bromuracil folgt der Gleichung (eine lineare Abhängigkeit des Dichtezuwachses von Substitutionsrate und G+C-Anteil vorausgesetzt) :

$$\Delta \rho = a \cdot X \cdot [1 - \text{(GC)}] \quad \text{(g/cm}^3\text{)}$$

Dabei ist X die Substitutionsrate in Prozent und a der Pro-

portionalitätsfaktor, der sich mit den Angaben von Fox und Meselson (1963; 0,032 g/cm³ Dichtezuwachs für Lambda-Partikel mit(G+C) = 0,47 und 100% Substitution) zu

$$a = 6,037 \cdot 10^{-4}$$

ergibt. (Dieser Proportionalitätsfaktor wird im Wesentlichen durch die Zunahme des Molekulargewichts der DNS bei Substitution der 5-CH₃-Gruppe im Thymidin durch ein Bromatom bestimmt. Deshalb sind die Angaben von Fox und Meselson hier ohne Einschränkung anwendbar.)

Damit gilt für die Dichte eines P22-Partikels mit durch Bromuracil dichtemarkierter DNS:

$$\rho = 0,049 \text{ (GC)} + 1,484 + 6,037 \cdot 10^{-4} \times [1 - \text{(GC)}] \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

Aus dieser Gleichung lassen sich nun auch mit bekannten Partikeldichten G+C-Gehalt oder Substitutionsrate wechselseitig berechnen.

Wir hatten für die i.P. unseres T-BU-Lysates eine Substitutionsrate von 40% bestimmt (S. 32). Es ist nun leicht zu sehen, daß bei dieser Substitutionsrate vollständig (in beiden Strängen) markierte Partikel mit höherem G+C-Anteil in der DNS auch stets eine höhere Dichte haben müssen. Die superschweren ara⁺-t.P. des Gradienten 1b (Fig.3) weisen also bei vollständiger Markierung eine geringere Substitutionsrate auf.

Diese läßt sich bei einem molaren G+C-Gehalt von 0,53 (mittl. G+C-Gehalt der Salmonella-DNS; tatsächlich haben ara⁺-t.P. in unmarkierten Lysaten eine Dichte von etwa 1,510 g/cm³) berechnen zu

$$X = 32\%$$

Alle Ergebnisse der bisherigen Analysen sind mit den hier für die DNS-Moleküle der drei Klassen allgemein transduzierender Partikel vorgeschlagenen Strukturen in guter Übereinstimmung. So bildet das Auffinden der Gruppe "super-schwerer t.P." nochmals einen überzeugenden Widerspruch zu der - nach den Cotransduktionsexperimenten bereits verworfenen - Hypothese, in der ein höherer Anteil phagenspezifischer DNS in der Struktur postuliert worden war. Es schien dennoch wünschenswert, die gewonnenen Modellvorstellungen in einem Experiment anderer Art zu überprüfen. Dabei sollte versucht werden, den Nachweis zu führen, daß tatsächlich ein Strang der bakteriellen DNS der "schweren t.P." komplett nach Phageninfektion repliziert und durch Bromuracil dichtemarkiert wurde, während die DNS des anderen Stranges vor dem Infektionszeitpunkt als intakte Struktur vorlag. Damit könnte auch gezeigt werden, daß die Struktur tatsächlich das Produkt einer semikonservativen Replikation der bakteriellen DNS ist, und die Dichtemarkierung nicht durch eine Reparatursynthese nach Phageninfektion erklärt werden kann. Eine solche Reparatursynthese müßte in beiden Strängen gleichmäßig erfolgen und - abhängig von der Länge der reparierten Sequenzen - zu einem Dichtezuwachs beider DNS-Stränge der "schweren t.P." führen (Cooper und Hanawalt, 1962).

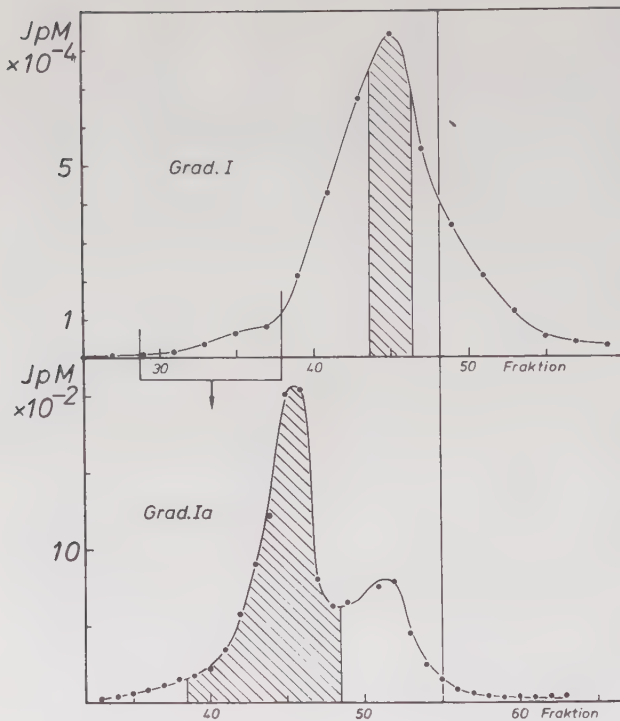
In einem ^3H -T-BU-Lysat wird die bakterielle DNS durch ^3H -Thymidin radioaktiv markiert. Die Dichtemarkierung aller nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion synthetisierten DNS erfolgt durch die Überführung der infizierten Zellen in das BU-haltige Markierungsmedium, das keine Radioaktivität

enthält (siehe Mat. u. Meth.).

In Figur 4 ist die Verteilung der Tritium-Impulse eines solchen - über den Stufengradienten gereinigten - Lysats in einem 30 ml-Gradienten dargestellt. Die Radioaktivität in den Fraktionen ließ sich einfach durch die Messung von 0,05 ml-Aliquots in Instagel (Packard) bestimmen. Die ebenfalls getestete (aber nicht dargestellte) Verteilung der his^+ -t.P. in diesem Gradienten stimmte gut mit der Verteilung der Tritium-Impulse überein, wies aber ihr Verteilungsmaximum bei geringfügig niedrigerer Dichte auf. Die ^3H -Impulse repräsentieren hier die Verteilung der Gesamtheit aller t.P. (mit Ausnahme solcher Partikel, deren DNS komplett nach Phageninfektion synthetisiert wurde, also der sogenannten "superschweren t.P."). Die his^+ -t.P. bilden nun aber eine Gruppe besonders leichter (also G+C-armen) Partikel, wodurch ihre niedrigere Dichte befriedigend erklärt ist.

Im dichteren Bereich der Verteilung ist wieder die "Schulter" "schwerer t.P." zu erkennen (Fig. 4, S. 44). Die Dichtegradientenanalyse dieser vereinigten Fraktionen in einem 3,5 ml-Gradienten (Ia) ist in Figur 4 dargestellt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wieder in Instagel. Hier bilden die "schweren t.P." den schmalen Hauptgipfel der Verteilung, während der Nebengipfel einen Anteil normaler t.P. im Gradienten anzeigt.

Nun wurden aus dem ersten und zweiten Gradienten die Fraktionen mit normalen und "schweren" t.P. (in Fig. 4 durch Schraffur gekennzeichnet) vereinigt und die DNS beider



Figur 4 : Gradienten I und Ia

Gradient I : Verteilung der Tritium-Impulse in einem 30 ml-CsCl-Gradienten eines 3H -T-BU-Lysates von HT 12/4. Der Gradient hatte 85 Fraktionen. Die für die zweite Zentrifugation vereinigten Fraktionen sind gekennzeichnet.

Gradient Ia : CsCl-Dichtegradientenanalyse der Tritium-Impulse aus den gekennzeichneten Fraktionen des Gradienten I in einem 3,5 ml-Gradienten (90 Fraktionen).

Die senkrechte Linie markiert in beiden Gradienten die Dichte des Referenzphagen H1. Aus beiden Gradienten wurden die durch Schraffur gekennzeichneten Fraktionen vereinigt, die DNS der Partikel getrennt extrahiert und in CsCl-Dichtegradienten analysiert. Einzelheiten des Verfahrens im Text.

Partikelarten separat durch Behandlung mit Sarkosyl NL 30 extrahiert (siehe Mat. u. Meth.).

Neutrale (Doppelstrang-) und alkalische (Einzelstrang-) Dichtegradientenanalysen der DNS dieser Partikel sollten nun nach der oben (Abb.2, S.39) postulierten Struktur eindeutig vorraussagbare signifikante Unterschiede in der Verteilung der Radioaktivität zeigen. Die Radioaktivität repräsentiert ausschließlich Stränge bakterieller DNS, die vor Phageninfektion vorhanden waren. (Bei P22 erfolgt nach Phageninfektion kein Abbau bakterieller DNS zu Mononukleotiden, die bei der Phagen-gesteuerten DNS-Synthese wiederverwendet werden könnten (Schmieger, 1971a; Schmieger und Buch, 1975)). Dann müssen die Tritium-Impulse der Doppelstränge aus normalen t.P. bei geringerer Dichte erscheinen, als die der Doppelstränge aus "schweren t.P.", welche durch die BU-Markierung eines Stranges eine höhere Dichte aufweisen müssen. Im (alkalischen) Einzelstranggradienten sollten alle Tritium-markierten Einzelstränge bei der gleichen Dichte auftreten, wenn sie von einheitlicher Struktur sind. Eine Reparatursynthese nach Phageninfektion würde die Tritium-Impulse der DNS der "schweren t.P." durch den BU-Einbau zu höheren Dichten verschieben.

Zur DNS-Präparation aus den "schweren t.P." wurde ein Aliquot der Präparation aus normalen t.P. (aus dem Grd. I) gegeben. Ein Drittel dieser DNS-Mischung wurde mit CsCl für den neutralen Gradienten vorbereitet. Der Rest wurde mit 1 M Na_3PO_4 denaturiert und für die Zentrifugation im alkalischen CsCl-Gradienten präpariert (s. Mat. u. Meth.).

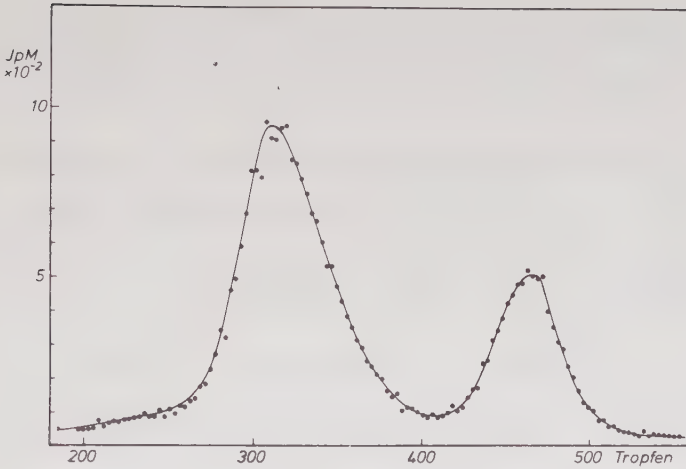
Die Figuren 5 und 6 geben die Verteilung der Tritium-Impulse in diesen Gradienten wieder. Dabei wurde die auf Glasfaserfiltern gefällte Radioaktivität von 3-Tropfen-Fraktionen im Toluol-Scintillator gemessen. Das Ergebnis ist eindeutig und übereinstimmend mit den aus der vorgeschlagenen Struktur gefolgerten Erwartungen. Der neutrale Gradient zeigt die gute Trennung der Doppelstrang-Moleküle aus normalen und "schweren" t.P. (Fig. 5, S.47), während die Verteilung im alkalischen Gradienten die einheitliche Struktur aller vor Phageninfektion vorhandenen (Tritium-markierten) Einzelstränge bakterieller DNS anzeigt (Fig. 6). (Über die Beteiligung eines kleinen Anteils an neusynthetisierter Phagen-DNS an den Strukturen (wie in Abb. 2, S.39 angedeutet) wie über die Moleküle der "superschweren t.P." enthalten diese Experimente natürlich keinerlei Information.)

Die Aussagen der bisherigen Experimente lassen sich nun folgendermaßen zusammenfassen:

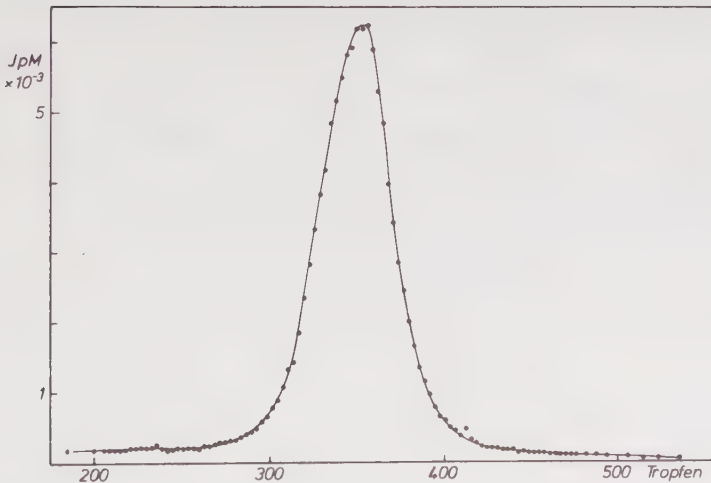
Es gibt in Lysaten von P22 transduzierende Partikel, die bakterielle DNS enthalten, welche nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion semikonservativ repliziert wurde. In T-BU-Lysaten können diese Partikel als diskrete Klassen "schwerer" und "superschwerer" t.P. identifiziert werden.

Die Dichten dieser Partikelklassen zeigen an, daß während dieser Replikation der bakteriellen DNS ein annähernd gleicher Anteil der Thyminbasen durch Bromuracil substituiert wird, wie bei der Replikation der

(weiter S. 48)



Figur 5



Figur 6

Verteilung der Tritium-Impulse im neutralen (Fig.5) und im alkalischen (Fig.6) 10 ml-CsCl-Gradienten. Die analysierte DNS wurde aus den normalen und "schweren" t.P. eines 3H -T-BU-Lysates von HT 12/4 extrahiert (siehe Fig. 4). Die Gradienten enthielten 650 Tropfen. Weitere Beschreibung im Text.

phagenspezifischen DNS der i.P..

Es wurde gezeigt, daß auch bei der Mutante HT 12/4 nur ein geringer Bruchteil der Gesamtmenge an t.P. diesen Klassen angehört und Partikel mit vollständig nach Phageninfektion replizierter Bakterien-DNS erheblich seltener auftreten, als Partikel mit einem neusynthetisierten Strang.

Nicht zufällig wurde nun die Frage nach der Natur der an diesen Partikeln beobachteten Replikation bakterieller DNS bisher offen gelassen. Diese DNS könnte das Syntheseprodukt einer nach Phageninfektion weiterlaufenden bakteriellen Replikation sein. Jene Argumente und experimentellen Ergebnisse, die gegen diese einfachste Annahme sprechen, stehen am Beginn des folgenden Abschnittes. Sie leiten dort zu einigen Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Phagen- und Bakterien-gesteuerter DNS-Replikation über, in deren Verlauf gezeigt wird, daß die bakterielle DNS der Klassen "schwerer" t.P. das Produkt einer Phagen-gesteuerten Replikation ist

II. Untersuchungen über die Beziehungen zwischen bakterieller und Phagen-kontrollierter DNS-Replikation

a) Hinweise auf geänderte Merkmale der DNS-Replikation nach Phageninfektion

Wie die Analyse der Klassen "schwerer" und "superschwerer" t.P. gezeigt hat, ist ein Teil der in t.P. verpackten bakteriellen DNS nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion repliziert worden. Die nächstliegende Annahme wäre es nun, diese DNS für das Produkt einer normalen, nach Phageninfektion weiterlaufenden, bakteriellen Replikation zu halten. Diese Replikation könnte

1. in Bakterien ablaufen, die zunächst noch nicht infiziert wurden. Eine spätere Infektion durch Phagen aus bereits lysierten Zellen könnte auch in diesen Zellen noch zur Produktion eines Phagenwurfes mit transduzierenden Partikeln führen.
2. in infizierten Bakterien für eine Zeitlang neben der Phagenreplikation ablaufen.

Es ist aber auch denkbar, daß diese Synthese bakterieller DNS ein Phagen-kontrollierter Vorgang ist.

Die erste Möglichkeit läßt sich durch folgende Sachverhalte ausschließen:

Bei einer Infektionsmultiplizität von 5 werden rein statistisch weniger als 1% der Bakterien von keinem Phagen getroffen. Bedingt durch die relativ kurze Adsorptionszeit von 3 Minuten (im Versuchsablauf beim T-BU-Lysat) wird der tatsächliche Anteil nicht infizierter Bakterien geringfügig

höher liegen. Aber der Anteil an Bakterien, die in einem Zeitraum von 80 Minuten nach einer sekundären Infektion reife Partikel bilden, wird wegen des Zeitbedarfs für die Synthese dieser Partikel verschwindend gering sein. In Minimalmedium werden nämlich die ersten Phagen und transduzierenden Partikel frühestens 50 Minuten nach Infektion freigesetzt. Wenn die bakterielle Chromosomenreplikation in Zellen, die zunächst nicht durch einen Phagen infiziert wurden, für die Synthese der DNS der "schweren t.P." eine Rolle spielte, müßte auch ein drastischer Effekt einer geänderten Infektionsmultiplizität zu beobachten sein. Das ist nicht der Fall: Eine Erhöhung der moi auf 10 (Phagen/Zelle) hat keinen Einfluß auf den relativen Anteil der Gruppe "schwerer t.P." an der Gesamtmenge transduzierender Partikel.

Gegen die 2. Annahme sprechen Beobachtungen, welche zeigen, daß in infizierten Bakterien die bakterielle DNS-Replikation nicht für längere Zeit ungestört fortgesetzt werden kann.

- Innerhalb von etwa 15 Minuten nach P22-Infektion kommt der Einbau radioaktiven Thymidins in bakterielle DNS (die durch ihr Sedimentationsverhalten in Sucrosegradienten charakterisiert werden kann) praktisch vollständig zum Stillstand (Smith und Levine, 1965; Botstein, 1968; Levine und Schott, 1971). Über genetische Determinanten und den Mechanismus dieser Abschaltung der Wirtsdns-Synthese ist nichts bekannt.

- Zu späteren Zeiten nach Infektion verhindert dann die bei HT 12/4-Infektion ab der 30. Minute nach-

weisbare Fragmentierung des Bakterienchromosoms für die Bildung der transduzierenden Partikel und die folgende Lyse der Bakterien eine Fortsetzung der bakteriellen Replikation am intakten Chromosom (Schmieger und Buch, 1975).

Nun erfordert aber eine vollständig neusynthetisierte DNS - Struktur, wie sie in den "superschweren t.P." vorliegt, das Ablaufen zweier Replikationen. Der bakterielle Replikationsort müßte also einen DNS-Abschnitt zweimal passiert haben. Auch das Chromosom von *Salmonella typhimurium* wird sequentiell repliziert und DNS-Syntheserate wie Anzahl der Replikationsorte pro Bakterium sind von den Wachstumsbedingungen abhängig (Lark, 1966; Chan und Lark, 1969). Die (mikroskopisch kontrollierte) Verdoppelungszeit der Bakterien ist in dem Bromdesoxyuridin enthaltenden Markierungsmedium mit ca. 2 Stunden drastisch höher, als die beim Wachstum in Medium mit Thymidin beobachtete ($t_d = 45$ Min.). Aus den Daten von Chan und Lark (1969) geht hervor, daß unter diesen Wachstumsbedingungen zwischen zwei Replikationen eines Chromosomenabschnittes ein Zeitabstand von mindestens 40 Minuten liegt. Diese Beobachtungen scheinen uns - mindestens für die Klasse der "superschweren t.P." - gegen die Annahme zu sprechen, ihre DNS sei das Produkt einer nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion weiterlaufenden normalen bakteriellen DNS - Replikation.

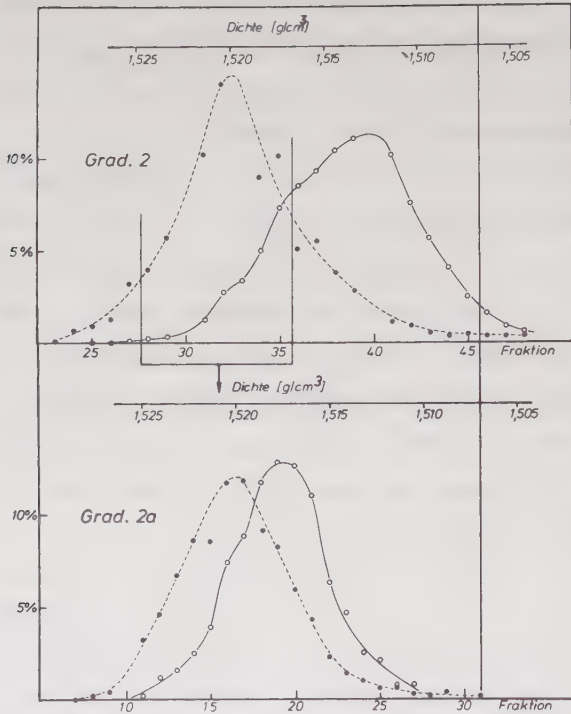
Auch andere Daten weisen eindeutig auf die nach Phageninfektion geänderten Bedingungen der DNS-Replikation hin. Aus den Dichten der Klassen "schwerer" und "superschwerer" t.P.

läßt sich ableiten, daß in ihrer bakteriellen DNS etwa der gleiche Anteil an Thyminbasen durch Bromuracil ersetzt wurde, wie in der Phagen-DNS der i.P. (siehe S. 37 ff.). Schon Schmieger hatte aber gezeigt, daß während des Bakterienwachstums BU wesentlich ineffektiver in die bakterielle DNS eingebaut wird, als nach dem Zeitpunkt der Infektion in die Phagen-DNS. Das muß aus den Dichten der Partikel von BU-BU-Lysaten (Wachstum der Bakterien in BU-haltigem Medium auch vor der Phageninfektion, siehe Mat. u. Meth.) gefolgert werden. Für die Hauptgruppe der t.P. beträgt nämlich hier der Dichtezuwachs gegenüber der unmarkierten Referenz nur etwa 40% des für die i.P. beobachteten Wertes (und ist damit auch geringer als der Dichtezuwachs der Gruppe "schwerer t.P." im T-BU-Lysat)(Schmieger, 1968). Nun wurde in diesen Experimenten der BU-Einbau durch die Hemmung der Thymidilat-Synthetase-Reaktion mit Aminopterin stimuliert. In meinen Experimenten verwendete ich eine thy⁻-Mutante. Die Analyse eines unter diesen Markierungsbedingungen gezogenen BU-BU-Lysates kann zeigen, ob auch hier die Feststellung Gültigkeit hat, daß während der bakteriellen DNS-Replikation BU mit geringerer Effizienz in die DNS eingebaut wird, als nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion.

Im BU-BU-Lysat wachsen die Bakterien vor der Phageninfektion für etwa 4 Generationen in BU-Medium. Die in diesem Zeitraum replizierte Bakterien-DNS wird durch den Einbau von BU dichtemarkiert, und nach dem Modell der semikonservativen Replikation (Meselson und Stahl, 1958) liegt nach 4 Generationen mehr als 90% der DNS in beiden Stängen markiert vor.

3,5 ml eines BU-BU-Lysates wurden mit dem H1 als Dichtereferenz im Schwingbecherrotor zentrifugiert. Figur 7 (S. 54) zeigt die Verteilung der i.P. und his^+ -t.P. in diesem CsCl-Gradienten (2). Das Maximum der Verteilung der t.P. liegt bei einer Dichte von $1,513 \text{ g/cm}^3$, während die i.P. ihr Verteilungsmaximum wieder bei $1,520 \text{ g/cm}^3$ bilden. Das bedeutet, daß während der DNS-Replikation vor Phageninfektion die Thyminbasen nur mit etwa 40% der Effizienz substituiert werden, die bei der Replikation nach Infektion erreicht wird. Die Dichte dieser t.P. ist auch geringer, als die der Gruppe "schwerer t.P." des T-BU-Lysates, für die nachgewiesen wurde, daß sie nur einen, nach Phageninfektion dichtemarkierten Strang aufweist.

Es läßt sich nun fragen, ob auch im BU-BU-Lysat solche t.P. nachgewiesen werden können, deren DNS unter den Bedingungen nach Phageninfektion dichtemarkiert wurde. Die auffallenden Diskontinuitäten im dichteren Bereich der Verteilung der his^+ -t.P. scheinen bereits anzudeuten, daß das der Fall ist. Eine Analyse der (in Fig. 7 gekennzeichneten) Fraktionen im dichteren Bereich der Verteilung in einem weiteren Gradienten (2a) zeigt, daß auch hier eine Gruppe transduzierender Partikel existiert, deren Dichte ($1,517 \text{ g/cm}^3$) zwischen der Hauptgruppe der t.P. dieses Lysats und den vollständig markierten i.P. liegt (Fig. 7, S.54). Auch in BU-BU-Lysaten läßt sich also eine Gruppe "schwerer" t.P. nachweisen, deren bakterielle DNS das Produkt von Replikationen unter den verschiedenen Markierungsbedingungen vor und nach Infektion ist. Die Schulter im dichteren Bereich der Verteilung



Figur 7 : Gradient 2 und 2a

Verteilung der i.P. und his⁺-t.P. eines BU-BU-Lysates von HT 12/4 in 3,5 ml-CsCl-Gradienten. Die Dichte des Referenzphagen H1 ist als senkrechte Linie bei 1,507 g/cm³ markiert.

Der Gradient 2 hatte 92 Fraktionen. Die in der zweiten Zentrifugation analysierten Fraktionen sind gekennzeichnet.

Gradient 2a : Dichtegradientenanalyse der Partikel aus den gekennzeichneten Fraktionen des Gradienten 2. (90 Fraktionen)

--●--●--●-- i.P. —○—○—○— t.P.

weist schließlich auf das Vorhandensein der dritten Gruppe transduzierender Partikel hin, deren DNS komplett nach Phageninfektion synthetisiert wurde, und welche deshalb die gleiche Dichte aufweist wie die i.P..

Diese Experimente zeigen, daß auch unter meinen Versuchsbedingungen die Bakterienreplikation zu einer deutlich geringeren Substitution von Thymin durch Bromuracil führt, als die DNS-Synthese nach der Phageninfektion. Diese ändert die DNS-Synthese-Bedingungen in der Weise, daß die beobachtete höhere Dichtemarkierung daraus resultiert.

Die bisher beschriebenen Beobachtungen sind Hinweise auf einen nach Phageninfektion geänderten Modus der Replikation bakterieller DNS und scheinen auch kaum mit der Hypothese in Einklang zu bringen zu sein, die DNS der "schweren" und "superschweren" t.P. sei das Syntheseprodukt normaler Bakterien-gesteuerter Replikation. Es ist aber notwendig, die Beziehungen zwischen bakterieller DNS-Replikation und Phagen-kontrollierter DNS-Synthese in Experimenten anderer Art genauer zu untersuchen. Dabei ist möglicherweise ein direkter Nachweis für den Einfluß der Phageninfektion auf die Synthese bakterieller DNS zu führen. Für die Problemstellung scheint ein experimenteller Ansatz am günstigsten, bei dem zum Zeitpunkt der Phageninfektion keine bakterielle Replikation mehr abläuft, aber die Replikation des Phagen uneinflußt ist. Nun gibt es verschiedene Möglichkeiten, die DNS-Replikation der Bakterien zu stoppen, etwa die Aushungerung auxotropher Mutanten für essentielle Aminosäuren oder Nukleoside (Maaløe und Hanawalt, 1961), oder die Ver-

wendung spezifischer Hemmstoffe der DNS-Replikation (Kornberg, 1974). Bei diesen Methoden wird allerdings auch die Phagenreplikation mehr oder minder drastisch beeinflusst. Aussichtsreicher, und für den Genetiker naheliegend scheint die Verwendung bestimmter konditional letaler Bakterienmutanten zu sein, die unter nicht permissiven Bedingungen die Replikation ihrer DNS einstellen. Die Untersuchung der Phagenreplikation in diesen Mutanten erlaubt Aussagen über die Abhängigkeit der Phagen-kontrollierten DNS-Replikation von Faktoren der Bakterienreplikation und kann unter bestimmten Bedingungen auch in unserer spezielleren Fragestellung weiterhelfen.

- b) Replikation von P22 in einer Mutante von *Salmonella typhimurium* mit einem temperatursensiblen Defekt in der Initiation der DNS-Replikation

Die Replikation des zirkulären bakteriellen Chromosoms ist ein komplexer Vorgang, der an einem genetisch festgelegten Ort, dem Origin, beginnt (Initiation der DNS-Replikation), sequentiell in Richtung auf den Terminus verläuft und zu semikonservativ replizierten Tochtermolekülen führt (Meselson und Stahl, 1958; Cairns, 1963; Caro und Berg, 1968; Nishioka und Eisenstark, 1970). Dabei scheint die Replikation meistens an zwei Orten abzulaufen, die - in entgegengesetzter Richtung auf dem Chromosom fortschreitend - zwei Replikationsgabeln bilden (Bird et al., 1972; Kuempel et al., 1973; Hara und Yoshikawa, 1973). Das Gleichgewicht zwischen Bakterienwachstum und -teilung einerseits und der DNS-Replikation andererseits scheint im Wesentlichen über die Regulation des Initiationsvorgangs gesteuert zu werden (Jacob et al., 1963; Rosenberg et al., 1963; Helmstetter et al., 1968; Sompayrac und Maaløe, 1973). Die Vorgänge in der Replikationsgabel konnten in den vergangenen Jahren durch genetische und biochemische Methoden in eine Vielzahl von Teilreaktionen zerlegt und die daran beteiligten Proteine zum Teil isoliert werden (Dressler, 1975). Für eine Anzahl von Bakterien-Spezies sind Mutanten der DNS-Replikation - meist konditional letale, temperatursensible (ts-) Mutanten - isoliert worden, die unter nicht permissiven Bedingungen eine Störung der bakteriellen DNS-Replikation zeigen. Diese Mutanten lassen sich grob zwei

Gruppen zuordnen:

- Mutanten, die einen Defekt in der Initiation der DNS-replikation haben. Diese Mutanten können unter nicht permissiven Bedingungen keine neuen Replikationsrunden starten. Die bereits ablaufende Replikation wird bis zum Terminus fortgesetzt (Gross et al., 1968; Spratt und Rowbury, 1970; Beyersmann et al., 1971; Bagdasarian et al., 1972; Beyersmann et al. 1974; Wada und Yura, 1974).
- Mutanten, die einen Defekt in der Elongation haben. Diese Mutanten stellen unter nicht-permissiven Bedingungen die Replikation ihrer DNS sofort ein. Hier liegt also eine Störung in den am eigentlichen Replikationsvorgang in der Replikationsgabel beteiligten Reaktionen vor (Carl, 1970; Wechsler und Gross, 1971).

Die Charakterisierung solcher Mutanten kann die Aufklärung der in vivo bei der DNS-Replikation notwendigen Funktionen nach Art und Zahl erleichtern und auch die Isolierung von Proteinen ermöglichen, die im biochemischen Test auf andere Weise kaum faßbar wären (Schekman et al., 1975).

Die Untersuchung der Replikation von Bakteriophagen in solchen Mutanten der bakteriellen DNS-Synthese erlaubt die Bestimmung der für die Phagenreplikation essentiellen Wirtsfunktionen und kann zur Klärung der oft sehr komplizierten Wechselwirkungen zwischen Wirts- und Phagen-codierten Proteinen bei der DNS-Replikation des Phagen beitragen (Lanka und Schuster, 1970; Beyersmann und Schuster, 1971; Georgopoulos und Herskowitz, 1971; Manheimer und Truffaut, 1974; Toussaint und Faelen, 1974; Yarmolinsky, 1975).

Das im Vergleich mit dem Bakterienchromosom wesentlich kleinere und einfacher handzuhabende Phagenchromosom ist auch ein ausgezeichnetes Modellsystem, um die an der DNS-Replikation beteiligten Reaktionen zu untersuchen. Im in vitro-System der Biochemiker werden heute bevorzugt die einsträngigen DNS-Moleküle einfacher Phagen als Substrat eingesetzt (Schekman et al., 1974).

Für *Salmonella typhimurium* sind nur wenige Mutanten mit einem Defekt in der DNS-Replikation beschrieben (Spratt und Rowbury, 1970 (dna C); Bagdasarian et al., 1972 (dna A); Whitfield und Levine, 1973 (pol I)). Von den zwei temperatursensitiven Mutanten, die beide einen Defekt in der Initiation der DNS-Replikation haben, verwandten wir in unseren Experimenten die Mutante TB 37 von Bagdasarian und Mitarbeitern (1972). Der Phänotyp dieser Mutante ist sehr gut charakterisiert:

- Die Mutante stellt in der nicht permissiven Temperatur von 42°C in angereichertem Minimalmedium nach einer Verzögerung von etwa 50 Minuten die Replikation ihrer DNS ein.
- Während dieser Replikation unter nicht permissiven Bedingungen werden bevorzugt die Termini der Chromosomen repliziert.
- Zellwachstum und Proteinsynthese verlaufen bei 42°C für längere Zeit normal.
- Die Rückkehr zur permissiven Temperatur (34°C) erlaubt die Wiederaufnahme der DNS-Replikation nur nach vorangegangener Proteinsynthese und setzt mit

einer Verzögerung von ca. 30 Minuten ein. Dabei werden bevorzugt die Origin-nahen Chromosomenregionen repliziert.

Diese Befunde zeigen eindeutig, daß durch die Mutation ein Protein betroffen ist, welches für die Initiation der DNS-Replikation notwendig ist und durch die höhere Temperatur irreversibel geschädigt wird. Eigentliche Replikationsfunktionen der Elongation scheinen nicht gestört zu sein. Übereinstimmung im Defekt und Kartierungsergebnisse legen nahe, daß das zum dna A-Genort bei Escherichia coli analoge Gen in der Mutante TB 37 betroffen ist (Bagdasarian et al., 1975).

1. Der Verlauf der DNS-Synthese in der Mutante TB 37 nach Infektion mit P22

Die DNS-Syntheserate in einer Kultur zum Zeitpunkt der Probenahme läßt sich recht einfach in Kurzzeit- (Puls-) Markierungsexperimenten mit ^3H -Thymidin bestimmen (Smith und Levine, 1964, siehe auch Mat. u. Meth.). Die Ergebnisse von Vorversuchen stellten zunächst sicher, daß die notwendige Proportionalität zwischen Radioaktivitätseinbau unter Versuchsbedingungen und der DNS-Syntheserate besteht. Tatsächlich ist die Aufnahme der Radioaktivität im Bereich eines Zelltiters von ca. 2×10^7 bis 2×10^8 Zellen/ml etwa proportional zum Wachstum der Kultur (hier bestimmt als Koloniebildungsvermögen, durch mikroskopische Zählung oder Trübungsmessung). Abweichungen von dieser Proportionalität können durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden :

- Beim Übergang der Kultur in die stationäre Phase nimmt die Zahl der Replikationsorte in der Kultur ab, weil mehr Replikationen terminiert als neu initiiert werden. Dann fällt die im Puls gemessene Syntheserate ab, obwohl die Zelldichte der Kultur noch zunimmt. Einen ähnlichen, wenn auch schnelleren Abfall der Syntheserate durch die Verhinderung von neuen Replikationsstarts beobachtet man bei der Mutante TB 37 nach Übergang zur nicht permissiven Temperatur (siehe die Figuren 8 bis 10).
- Änderung der Thymidin-Konzentration im Medium während des Wachstums der Kultur. So werden für die Synthese von 10^8 Salmonella-Chromosomen (bei einer mit dem E. coli-Chromosom vergleichbaren Molekülgröße) ca. 2×10^{14} Thymidin-Moleküle verbraucht. Das Wachstumsmedium enthält aber nur etwa 5×10^{15} Thymidin-Moleküle/ml, so daß sich bei höheren Zellzahlen die Konzentration des Thymidins mit dem Wachstum merklich verringert. Diese Änderung der Thymidin-Konzentration im Medium hat zur Folge, daß die spezifische Radioaktivität während des Pulses im Laufe des Wachstums der Bakterienkultur etwas ansteigt. Dieser Effekt ließe sich durch eine höhere Thymidin-Konzentration im Medium (oder Messung bei geringerer Zelldichte) praktisch ganz ausschließen. Man müßte dann aber eine wesentlich schwächere Markierung in Kauf nehmen, oder beim Puls mehr Radioaktivität einsetzen.

Es war wünschenswert, die Messungen in den angegebenen Zell-

dichtebereichen durchzuführen, weil sie auch als Vorversuche für solche Experimente dienten, bei denen ein genügend hoher Lysattiter erreicht werden mußte (Abschnitt IIc). Ich habe die Wachstumsbedingungen immer so gewählt, daß zum Zeitpunkt der Phageninfektion eine direkte Proportionalität zwischen Radioaktivitätseinbau und Zellvermehrung bestand. Die Markierungsdauer von 2 Minuten paßte am besten in den zeitlichen Ablauf der Pulse nach Phageninfektion. Es wurde sichergestellt, daß auch bei dieser Markierungsdauer der Radioaktivitätseinbau direkt proportional zur zeitlichen Dauer des Pulses ist. Desoxyadenosin im Medium (s. Mat. u. Meth.) stimulierte die Tritiumaufnahme nicht und verschlechterte die Proportionalität zwischen Wachstum und Einbau in den untersuchten Zelldichtebereichen.

Im ersten zu beschreibenden Experiment sollte die DNS-Synthese nach Infektion mit der Phagenmutante HT 12/4 - die ja auch das Untersuchungsobjekt bei den Dichtegradientenanalysen war - verfolgt werden. Dabei lief die Infektion der Mutante TB 37 unter den permissiven und nicht permissiven Bedingungen für die bakterielle DNS-Replikation ab. Die Abbildung 3 (folg. Seite) zeigt ein Schema des Versuchsablaufs der Pulsexperimente. Die Einbauraten der uninfizierten und infizierten Kultur wurden jeweils parallel bestimmt.

Figur 8 (S. 64) zeigt in halblogarithmischer Darstellung die zu verschiedenen Zeiten gemessenen ^3H -Thymidin-Einbauraten von uninfizierten und infizierten Kulturen von TB 37. Gleichzeitig ist das als Koloniebildungsvermögen bestimmte

Übernachtkultur von TB 37

1:400 verdünnt in TCG-2 (2 μ g Thymidin/ml)

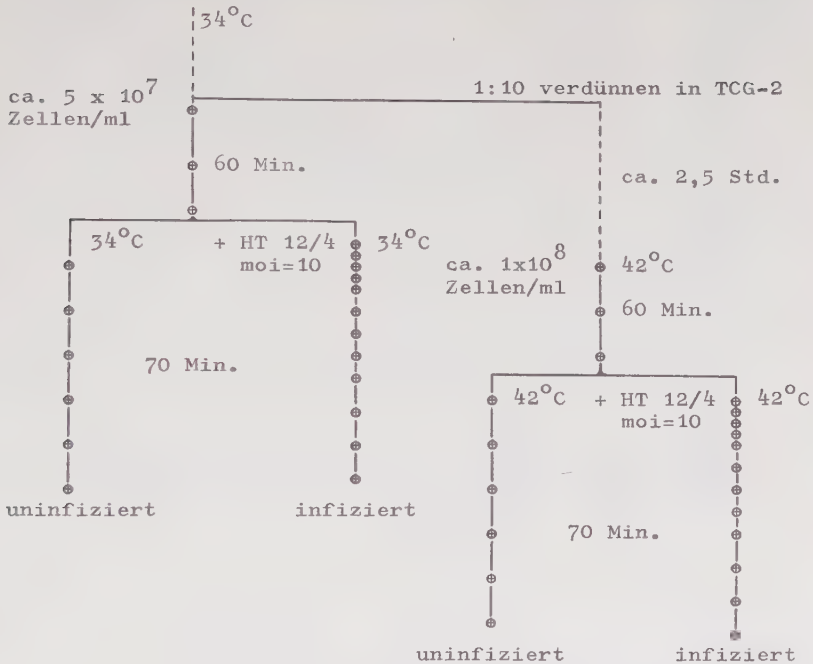
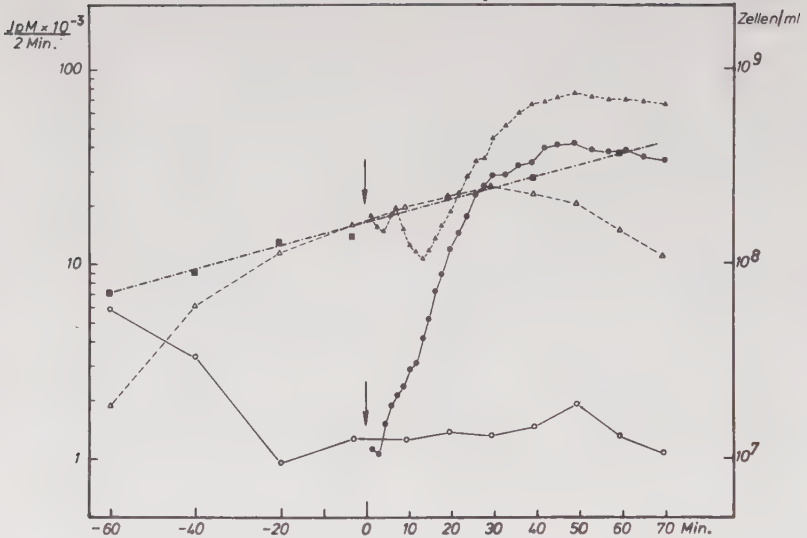


Abbildung 3

Zeitlicher Ablauf eines Kurzzeit-Markierungsexperimentes

• : Probenahme (technische Details siehe Mat. u. Meth.)

Wachstum der bei 34°C vermehrten Kultur eingetragen. In Figur 9 (S. 65) ist das gleiche Experiment bei linearer Auftragung des Radioaktivitätseinbaus dargestellt, um den absoluten Betrag der jeweils gemessenen Einbauraten zu verdeutlichen. Die nacheinander bestimmten (s. Abb.3) Einbauraten der bei 34°C und 42°C wachsenden Kulturen werden durch die gleiche Zeitskala direkt miteinander verglichen.

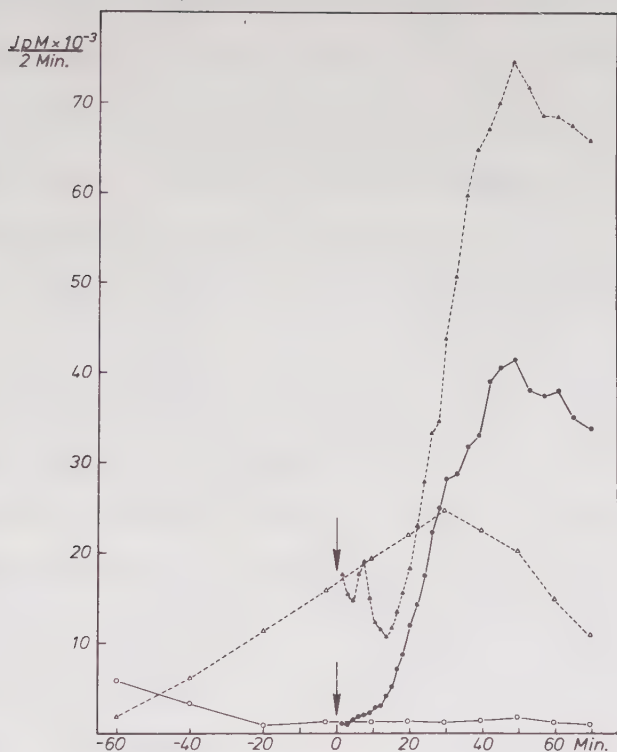


Figur 8

^3H -Thymidin-Einbau bei Kurzzeitmarkierung von nicht infizierten und mit HT 12/4 infizierten Kulturen von TB 37 bei 34°C und 42°C . Der Zeitpunkt der Phageninfektion (0 Min.) ist markiert. Auf der Ordinate ist die in 2 Minuten eingebaute Tritium-Aktivität in Impulsen pro Minute (IpM) angegeben. Für die bei 34°C wachsende Kultur ist auch die Zunahme des Lebendkeimtitters eingetragen.

Zeitlicher Ablauf des gesamten Experimentes siehe Abb. 3 (S. 63). Technische Angaben zur Pulsmarkierung in Mat. u. Meth..

---Δ---Δ--- 34°C , uninferiert; ---▲---▲--- 34°C , inferiert
 —○—○—○— 42°C , uninferiert; —●—●—●— 42°C , inferiert
 ---■---■--- Titer (Koloniebildung) der bei 34°C wachsenden Kultur



Figur 9

Darstellung des in Fig. 8 wiedergegebenen Experimentes bei linearer Auftragung der in 2 Minuten eingebauten Radioaktivität . Legende siehe Seite 64 .

Die Zellvermehrung der bei 34°C wachsenden Kultur ist hier nicht eingetragen.

In der uninfizierten Kultur bei 34°C steigt die Einbaurate bis zur 90. Minute nach Versuchsbeginn etwa linear an. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Kultur einen Titer von ca. 3×10^8 Zellen/ml. Die danach abfallende Einbaurate zeigt die Abnahme der DNS-Syntheserate in der Kultur wegen des Übergangs zur stationären Phase an. Die während des Versuchs parallel bestimmte Lebendkeimzahl der Kultur weist während der gesamten Versuchsdauer einen logarithmischen Anstieg mit einer Verdoppelungszeit von etwa 50 Minuten auf.

Beim Übergang zur nicht permissiven Temperatur von 42°C fällt in der uninfizierten Kultur die Einbaurate rasch ab, und nach ca. 40 Minuten wird ein niedriges Niveau des Radioaktivitätseinbaus erreicht, das im folgenden Beobachtungszeitraum etwa konstant bleibt. Neben einem unspezifischen Einbau spielt dabei auch ein geringer Anteil an semikonserverativer Replikation eine Rolle. Dieser ist durch die "leakiness" der Mutante und die von der Funktion des dna A-Produkts unabhängige Replikation eines in Salmonella-Stämmen vorhandenen Plasmids bedingt (Bagdasarian et al., 1972; 1975). Diese Einbaurate lag in allen Experimenten - abhängig vom Zeitpunkt des Übergangs zur nicht permissiven Temperatur während des Kulturwachstums - zwischen ca. 1000 und 2000 IpM (Impulse pro Minute) pro 2 Minuten Markierungsdauer. Die - graphisch nicht dargestellte - Lebendkeimzahl der Kultur steigt nach Übergang zu 42°C noch für 60 bis 80 Minuten logarithmisch an und bleibt dann unverändert.

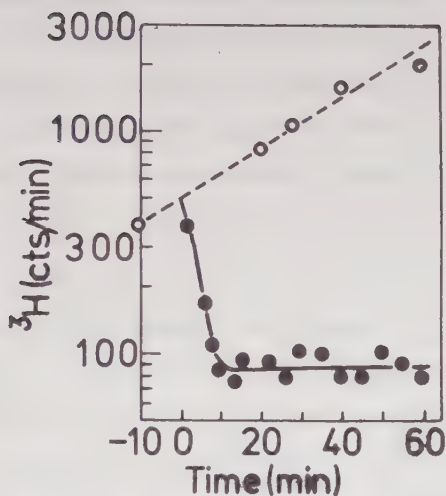
Nach Infektion mit HT 12/4 folgt bei 34°C die Änderung der Einbauraten mit der Zeit einer Kurve, die für die Infektion

von *Salmonella typhimurium* mit c2-Mutanten des Phagen P22 charakteristisch ist (Smith und Levine, 1964). Einem kurzzeitigen Abfall der Gesamtsyntheserate folgt ein Anstieg mit dem Gipfel zwischen der 7. und 8. Minute. Der anschließende steile Abfall bis zur 13. Minute ist nur bei intakter c1-Funktion zu beobachten. Hier ist die Syntheserate in der infizierten Kultur nur noch knapp halb so hoch wie in der uninfizierten Kontrolle. Der folgende Anstieg ist auf die Phagen-DNS-Replikation bei Ausfall der Repressor- (c2-) Funktion zurückzuführen. Diese DNS-Syntheserate übersteigt die Rate in der uninfizierten Kontrolle beträchtlich und nimmt erst von der 50. Minute nach Infektion an nicht mehr zu. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Lyse der Bakterien.

Auch nach Infektion bei 42°C wird von der 4. Minute an ein Anstieg der DNS-Syntheserate beobachtet. Der Betrag der gemessenen Einbaurrate ist wesentlich geringer als bei 34°C (siehe Fig.9, S. 64). Hier - wie in der etwas geringeren maximalen Syntheserate (50. Min.) - mag ein Aktivitätsrückgang von Stoffwechselleistungen eine Rolle spielen, die als Folge des Wachstums der Zellen in der nicht permissiven Temperatur sekundär betroffen werden. Die logarithmische Darstellung zeigt bis zur 7. Minute einen ähnlichen Anstieg der Syntheserate wie in der permissiven Temperatur. Ein Abfall der Einbaurrate nach der 7. Minute, der bei 34°C die frühe phagengesteuerte DNS-Synthese von einem ab der 13. Minute erkennbaren zweiten Anstieg trennte, ist nicht zu beobachten. Ein Hinweis auf das Vorliegen zweier unterschiedlich regulierter und zu verschiedenen Zeiten nach Infektion

beginnender phagengesteuerter Syntheseabschnitte dürfte die Diskontinuität im Anstieg der DNS-Syntheserate zwischen der 7. und 12. Minute sein. Hier wird die Reprimierung der frühen Synthese überlagert durch den beginnenden Anstieg der zweiten Synthese. Der maximale Anstieg dieser Syntheserate wird zwischen der 12. und 22. Minute beobachtet. In diesem Zeitraum verdoppelt sich die Syntheserate alle 4 Minuten.

Die Messung der Einbaurates des im Puls angebotenen radioaktiven Thymidins ist der Gesamt-DNS-Syntheserate in der Kultur proportional und ihre Änderung gibt (im günstigen Fall, siehe auch Diskussion) die Summe der auf Phagen- und Bakterien-DNS-Replikation wirkenden Einflüsse wieder. Deshalb läßt die Überlagerung der phagengesteuerten DNS-Syntheseraten in der Kurve bei 42°C nicht den Zeitpunkt des Einsetzens eines zweiten Replikations-Abschnittes erkennen. Der Kurvenverlauf bei 34°C wird noch durch einen beträchtlichen Anteil an bakterieller Replikation beeinflußt, die als Folge der P22-Infektion rasch unterdrückt wird (Smith und Levine, 1965; Levine und Schott, 1971). Figur 10 (S.69) soll die Kinetik dieses Vorgangs verdeutlichen. Dort ist der Verlauf des ³H-Thymidin-Einbaus nach Infektion mit einer P22-Mutante dargestellt, die einen Defekt im Gen 18 trägt. Unter nicht permissiven Bedingungen läuft bei dieser Mutante keine phagengesteuerte DNS-Replikation ab und der Verlauf der Einbauraten gibt ausschließlich den Einfluß der Infektion auf die Wirts-DNS-Synthese wieder. - Durch diese gleichzeitige Reprimierung der bakteriellen DNS-Synthese wird die Abschaltung der frühen phagengesteuerten Synthese bei 34°C



Figur 10

Einbausraten von ^3H -Thymidin bei 37°C (hier: nicht permissive Temperatur) in Zellen, die mit P22 ts18.1 c1 infiziert wurden

--○--○--○-- uninfectierte Kontrolle; —●—●—●— ts 18.1 c1-infizierte Zellen

(Aus Levine und Schott, 1971)

im Abfallen der Syntheserate deutlicher kenntlich. Ein neuer Anstieg der Einbausrate kann erst wieder beobachtet werden, wenn die Zunahme der phagengesteuerten Replikation rascher als diese Vorgänge erfolgt (14. Minute). Bei 34°C wird die maximale Zunahme der Syntheserate zwischen der 15. und 25. Minute beobachtet (Verdoppelungszeit ca. 7,5 Min.).

In der temperatursensiblen Mutante TB 37 läuft also unter

nicht permissiven Bedingungen - wenn zum Zeitpunkt der Infektion keine bakterielle Replikation mehr erfolgt - eine Phagen-gesteuerte DNS-Synthese ab. Die Experimente deuten auf eine weitgehende Übereinstimmung zwischen diesen und den bei der permissiven Temperatur ablaufenden Synthesevorgängen.

Die Gültigkeit dieser Aussage wurde in einem weiteren Experiment untersucht, in welchem die Infektion mit dem Wildtyp des Phagen P22 durchgeführt wurde. Eine solche Infektion führt in Wildtyp-Bakterien bei hoher Infektionsmultiplizität zur Lysogenisierung der Bakterien. Die Pulsmarkierung zeigt einen charakteristischen Verlauf, der von der lytischen Infektion mit c2-Mutanten deutlich zu unterscheiden ist (Smith und Levine, 1964). In unserem Versuch wurden die Bakterien mit einer Infektionsmultiplizität von 20 infiziert. Als permissive Kontrolle wurde hier der Bakterienstamm TB 98 bei 42°C vermehrt und infiziert. Dadurch sollte verhindert werden, daß der Vergleich mit der Infektion von TB 37 bei 42°C durch Temperatureffekte auf die Kinetik der ablaufenden Synthesen oder die Lysogenisierungswahrscheinlichkeit gestört wird. Der Stamm TB 98 ist isogen mit TB 37 bis auf den fehlenden dna_{ts}-Marker und eine Auxotrophie (siehe Mat. u. Meth.). Die Kulturen wurden bis zum Versuchsbeginn bei 34°C gezogen und dann in 42°C überführt. Im übrigen gleicht der Versuchsablauf dem im vorhergehenden Experiment.

Figur 11 zeigt die in der uninfizierten Kultur von TB 98 mit dem Wachstum ansteigende ³H-Thymidin-Einbaurrate bis

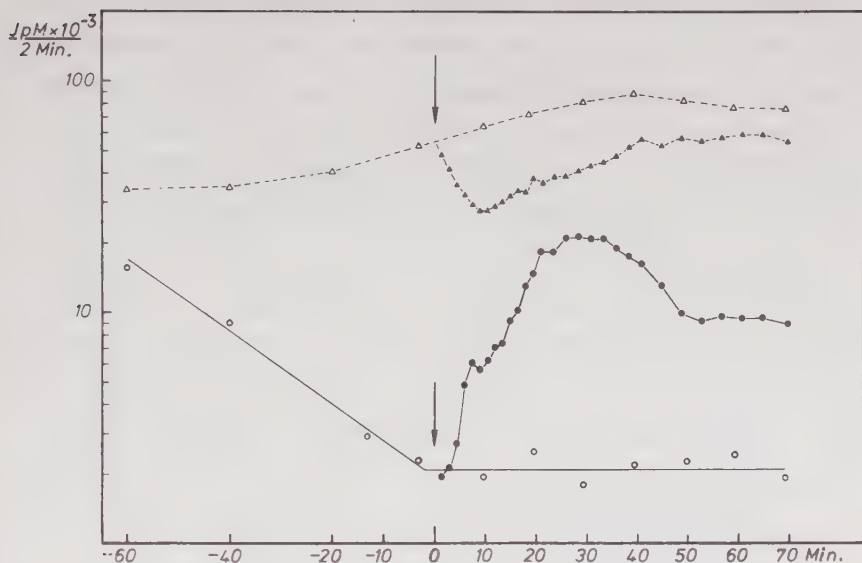
zu einem Zeitpunkt von 100 Minuten nach Versuchsbeginn. Danach beginnt aus bekannten Gründen die Einbaurrate geringfügig abzufallen. Wie schon im vorhergehenden Versuch gezeigt, fällt bei TB 37 nach Überführung der Kultur in 42°C die Einbaurrate rasch ab und erreicht nach ca. 60 Minuten ihr niedrigstes Niveau.

Die Infektion von TB 98 mit H1 (Wildtyp von P22) führt zu einem mit dem Zeitpunkt der Infektion beginnenden starken Abfall der Einbaurrate bis zu einem niedrigsten Wert in der 10. Minute. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die Markierung nur noch etwa 40% der uninfizierten Kontrolle. Der folgende Anstieg der Markierungsrate erfolgt zunächst geringfügig rascher als in der Kontrolle. Etwa ab der 40. Minute ist dann keine relative Änderung des Radioaktivitätseinbaus zwischen infizierter Kultur und uninfizierter Kontrolle mehr festzustellen.

Im geschilderten Kurvenverlauf ist keine Andeutung der frühen phagengesteuerten DNS-Synthese zu erkennen. Smith und Levine (1964) zeigen in ihren Pulsmarkierungsexperimenten, auch nach Infektion mit dem H1, einen die Abschaltung der bakteriellen Replikationsvorgänge deutlich übersteigenden Gipfel früher phagengesteuerter DNS-Synthese mit einem Maximum zwischen der 7. und 9. Minute. Ich habe geprüft, ob durch die höhere Temperatur von 42°C Kinetik und /oder zeitliches Einsetzen dieser Vorgänge vielleicht so geändert sind, daß der Synthesegipfel neben dem Abschalten der bakteriellen DNS-Replikation nicht erkennbar wird. Das ist nicht der Fall: Auch bei 34°C folgt nach H1-Infektion in

meinen Experimenten die Radioaktivitäts-Einbaurrate der gleichen Kurve, wie nach Infektion von TB 98 bei 42°C (Fig. 11, S.73). In keinem Fall ließ sich die Ausprägung der frühen phagengesteuerten Synthese bei H1-Infektion und den für die bakterielle Replikation permissiven Bedingungen als Gipfel zwischen der 7. und 9. Minute nach Infektion erkennen. Eine eindeutige Erklärung für diese Diskrepanz zwischen meinen Experimenten und den Beobachtungen von Smith und Levine (1964) kann leider nicht angeboten werden. Daß meine Messungen im Wesentlichen die DNS-Syntheserate in den Kulturen wiedergeben, wird am überzeugendsten durch den mit der Erwartung übereinstimmenden Verlauf bei der Mutante TB 37 nach Übergang zur nicht permissiven Temperatur von 42°C demonstriert. Hier wird auch das recht niedrige Niveau eines möglicherweise unspezifischen Einbaus deutlich. (siehe auch Diskussion)

In Figur 11 (S.73) zeigt der Verlauf der Pulsmarkierung beim Stamm TB 37 in der nicht permissiven Temperatur, daß hier ein früher Anstieg phagenkontrollierter DNS-Synthese mit einem Gipfel in der 7. Minute nachgewiesen werden kann. Nach der 8. Minute erfolgt ein weiterer starker Anstieg der Syntheserate, der bis zur 25. Minute ähnlich rasch wie bei der c2-Infektion verläuft (Verdoppelungszeit ca. 7 Min.). Aber hier erreicht die Markierungsrate ihren höchsten Wert zwischen der 25. und 35. Minute und fällt danach bis zur 50. Minute rasch ab. Zu dieser Zeit wird ein konstantes Niveau des Einbaus erreicht, das allerdings beträchtlich über dem der uninfizierten Kontrolle liegt.



Figur 11

Einbauraten von ^3H -Thymidin bei Infektion mit H1. Die Kulturen von TB 98 und TB 37 wurden 60 Minuten vor Infektion in 42°C überführt. Der Zeitpunkt der Phageninfektion (0 Min.) ist gekennzeichnet. Im übrigen gleicht der Ablauf des Versuches dem in Abb. 3 (S.63) dargestellten. Die in 2 Minuten Markierungsdauer eingebaute Tritium-Aktivität wird in IpM (Impulse pro Minute) angegeben. Zur Durchführung der Markierung siehe Mat. u. Meth.

--Δ--Δ--Δ--TB 98, uninfiziert;--▲--▲--▲--TB 98, infiziert mit H1
 --○--○--○--TB 37, uninfiziert;--●--●--●--TB 37, infiziert mit H1

Der Anstieg der Syntheserate nach der 8. Minute kann nicht eindeutig interpretiert werden. In den Experimenten von Smith und Levine wird bei Wildtyp-Infektion in der 13. Minute ein Minimum des Radioaktivitätseinbaus erreicht. Nach dieser Zeit ist der Vorgang der Integration des Prophagen beendet und ein folgender langsamer Anstieg der Syntheserate (wie er nach der 10. Minute bei Infektion von TB 98 zu beobachten ist) wird als Wiederaufnahme der Replikation bakterieller DNS beschrieben. Diese Aussage wird durch das mit bakterieller DNS identische Sedimentationsverhalten der in dieser Zeit markierten DNS plausibel gemacht (Smith und Levine, 1965). Es scheint so, als sei die Funktion der für die Phagen-DNS-Replikation und die Lysogenisierung notwendigen Phagen-Gene 12 und 18 für diesen Vorgang nicht notwendig. Temperatursensible Mutanten mit einem Defekt dieser Gene zeigen bei c⁺-Infektion unter nicht permissiven Bedingungen den gleichen Wiederanstieg der DNS-Synthese in den nicht lysogenisierten Zellen (Levine und Schott, 1971). Weil der temperatursensible Initiationsdefekt der Mutante TB 37 die Aufnahme der normalen bakteriellen Replikation verhindert, ist die nach Infektion in nicht permissiver Temperatur ansteigende DNS-Syntheserate eindeutig Phagen-gesteuert. Man könnte daran denken, daß unter diesen Bedingungen die Infektion mit dem H1 häufiger lytisch verläuft, aber die Abnahme der Einbauraten nach der 35. Minute zeigt eher einen nicht lytischen Verlauf der Infektion an und kann als Expression der Wirkung des c2-Repressors auf die Phagen-DNS-Replikation angesehen werden. Schließlich ließe sich diese Synthese auch durch eine zeitlich begrenzte Replikation (auch bakterieller DNS) nach einem der integrativen

Suppression ähnelnden Mechanismus erklären. Ein möglicher Hinweis darauf ist auch in dem deutlich über der uninfi-zierten Kontrolle liegenden Niveau der Einbauraten zu spä-ten Zeiten nach Infektion zu sehen.

Eine Suppression des dna_{ts} -Phänotyps der Mutante TB 37 durch die Integration von Episomen wurde durch Bagdasarian et al. beschrieben (1975). Hier wird offensichtlich durch das Genom des integrierten Episoms eine von der Funk-tion des dna A-Genproduktes unabhängige Initiation der Replikation des gesamten Salmonella-Chromosoms ermöglicht. Ähnliche Phänomene werden für temperente Bakteriophagen beschrieben (Lindahl et al., 1971). - Die Integration des P22-Genoms supprimiert den Defekt der Mutante TB 37 aber nicht für längere Zeit: lysogenisierte Zellen sind tempe-ratursensitiv wie der Ausgangsstamm. Die Suche nach Phagen-mutanten, deren genetische Konstitution die permanente inte-grative Suppression des dna A_{ts}-Defekts ermöglichte, war bisher nicht erfolgreich. Sie wird erschwert durch einen relativ hohen Anteil an Revertanten in Kulturen von TB 37.

Es läßt sich nicht eindeutig entscheiden, ob die Synthese-vorgänge, die nach der Infektion von TB 37 bei 42°C mit dem Wildtyp von P22 erkennbar sind, unter den für die bak-terielle Replikation permissiven Bedingungen (bei Infektion von TB 98) in der gleichen Weise ablaufen - und nur durch die Überlagerung mit dem Verlauf der bakteriellen DNS-Syn-these nicht erkennbar sind -, oder ob hier der Defekt der Mutante TB 37 einen Einfluß auf den Ablauf der Phagen-gesteu-erten Reaktionen hat.

Die Fragestellung, die Ausgangspunkt dieser Versuche war, läßt sich aber klar beantworten. Es wurde gezeigt, daß in der Mutante TB 37 eine Phagen-gesteuerte DNS-Replikation stattfindet, auch wenn - unter den für die Initiation nicht permissiven Bedingungen - keine bakterielle DNS-Synthese mehr abläuft. Die frühe Phagen-kontrollierte DNS-Synthese, die bei Wildtypinfektion eine der Voraussetzungen für die Lysogenisierung ist, wird bei c^+ -Infektion (Fig. 11, S. 73) in der gleichen Weise beobachtet, wie nach $c2$ -Infektion (Fig. 8, S. 64). Auch der spätere Verlauf der DNS-Syntheseraten gibt keinen Hinweis darauf, daß der Defekt der Mutante TB 37 einen Einfluß auf die Replikationsfunktionen des Phagen hat.

2. Phagenreifung in der Mutante TB 37 bei 42°C

Mit dem Nachweis einer Produktion reifer Phagenpartikel in TB 37 bei 42°C läßt sich am einfachsten demonstrieren, daß die phagengesteuerte Replikation zu den für die Phagenreifung notwendigen DNS-Strukturen führt. Es sind dies - wie für den P22 und viele andere Phagen nachgewiesen - Tandemstrukturen mehrfach hintereinandergeschalteter Phagen Genome, sogenannte Konkatemere. Von diesen Molekülen wird bei Phagen mit zirkulär permutiertem Genom ein jeweils durch die Kapazität der Phagenhülle bestimmter Anteil verpackt.

Nun gibt es bei P22 einen späten Schritt der Phagenreifung, der auch beim Wildtyp temperatursensitiv ist, so daß bei 42°C kaum reife infektiöse Phagenpartikel entstehen. Bei 42°C vermehrte Lysate enthalten überwiegend Kopfstrukturen

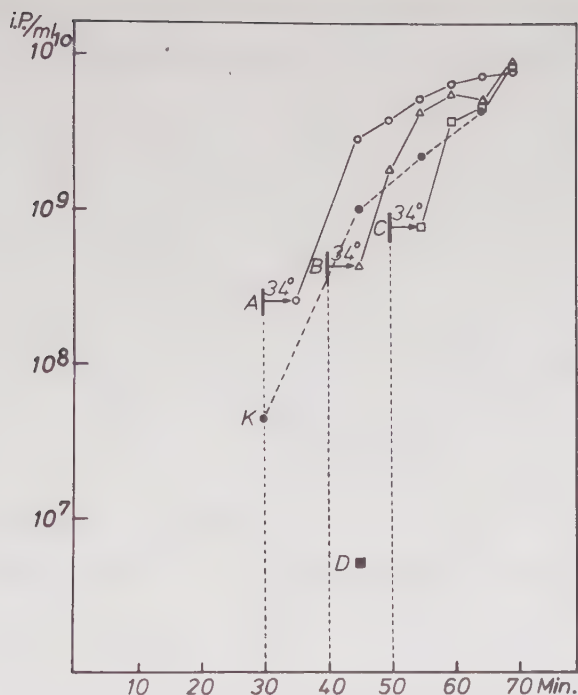
ohne die für die Anheftung an die Bakterienoberfläche notwendige Bodenplatte. Diese Kopfstrukturen sind intakte Vorstufen des reifen Phagenpartikels, denn in vitro gelingt der Zusammenbau dieser Köpfe mit den gereinigten Untereinheiten der Bodenplatte. Dabei entstehen infektiöse Partikel, die auch elektronenoptisch den normalen Phagenpartikeln gleichen (Israel et al., 1967; Israel, 1967). Es ist bisher nicht vollständig geklärt, ob die Synthese der Bodenplattenproteine oder ein späterer Schritt des Phagen-Zusammenbaus temperatursensibel ist. Die Kinetik der Bildung intakter Partikel bei niedriger Temperatur in meinen Experimenten weist eher auf einen Defekt in einem späten Morphopoiese-Schritt hin.

In unseren Untersuchungen sind wir an dem Nachweis intakter, mit reifer DNS gefüllter Phagenköpfe interessiert. Wir könnten also die Strukturen eines bei 42°C vermehrten Lysats mit gereinigten Bodenplattenproteinen komplementieren und die Entstehung reifer Partikel prüfen. Ebenso aussagefähig und einfacher durchzuführen schienen Temperatursprung-Experimente zu sein, in denen die Infektion und frühe Zeiten der Phagen-Replikation bei 42°C ablaufen, und einige Zeit vor der Lyse die Kultur wieder in die permissive Temperatur von 34°C überführt wird. Vorexperimente zeigten, daß die Infektion bei 42°C normal abläuft und reife Partikel im Wildtypbakterium und der Mutante TB37 in gleicher Anzahl und mit ähnlicher Kinetik entstehen wie bei 34°C, wenn die infizierte Kultur 20 Minuten nach Infektion in die permissive Temperatur überführt wird. Für die Eindeutigkeit

der

Versuchsaussagen war es wünschenswert, die Zeit der Phagenentwicklung bei 42°C auszudehnen, um die für die DNS-Replikation von TB 37 nicht permissiven Bedingungen einzuhalten.

Eine Kultur von TB 37, die eine Stunde vor Infektionszeitpunkt in 42°C überführt worden war, wurde mit HT 12/4 infiziert (moi=10). Nach drei Minuten Adsorptionszeit wurden die infizierten Komplexe auf Filtern gesammelt, mit vorgewärmtem TCG-20 gewaschen, um die nicht adsorbierten Phagen zu entfernen, in vorgewärmtes TCG-20 überführt und bei 42°C weiter belüftet. Aliquots der Kultur wurden zu unterschiedlichen Zeiten in 34°C gebracht, dort weiterbelüftet und in Zeitabständen der Phagentiter in chloroformierten Proben bestimmt. Figur 12 (S. 79) zeigt, daß die Phagenreplikation unter den für TB 37 nicht permissiven Bedingungen zu intakten Vorstufen reifer Partikel führt, denn die Zeitdauer der nicht permissiven Bedingungen während der Phagenreifung beeinflußt den erreichbaren Endtiter nicht. Je später der Sprung zur permissiven Temperatur von 34°C erfolgt, desto rascher wird der Endtiter erreicht. Dieser Befund zeigt klar an, daß nur noch ein später Schritt der Phagenreifung bei dieser Temperatur ablaufen muß. Die Notwendigkeit der Rückkehr nach 34°C wird durch eine Titerbestimmung (D, 45 Min. nach Infektion) erhärtet, die direkt aus der Temperatur von 42°C erfolgte und zwei bis drei Zehnerpotenzen unter den Titern der Kulturen bei 34°C lag. Diese Titerbestimmung verdeutlicht auch die Kinetik des bei 34°C ablaufenden und in 42°C gestörten Phagenreifungsprozesses, wenn man mit dem Titer in der Kultur vergleicht (B), die fünf Minuten vorher in 34°C überführt worden war.



Figur 12

Temperatursprung-Experiment

Reifung von Vorstufen infektiöser Partikel (i.P.) in der Mutante TB 37 bei der nicht permissiven Temperatur von 42°C . Zum Ablauf des Versuchs siehe Text Seite 78.

Titer der i.P. in chloroformierten Proben

- A: —○—○— Subkultur, nach 30 Min. in 34°C überführt
- B: —△—△— Subkultur, nach 40 Min. in 34°C überführt
- C: —□—□— Subkultur, nach 50 Min. in 34°C überführt
- D: ■ , Titerbestimmung aus der bei 42°C wachsenden Kultur
- K: --●---●-- Titer eines bei 34°C vermehrten Kontrolllysats

Dieser Versuch bestätigt noch einmal, daß unter den für die Initiation der bakteriellen DNS-Replikation nicht permissiven Bedingungen in der Mutante TB 37 die lytische Infektion durch den P22 normal abläuft. Die Funktion des temperatursensiblen Proteins dieser Mutante ist nicht für die Initiation oder einen späteren Schritt der phagengesteuerten DNS-Replikation notwendig. Bei 42°C werden intakte Vorstufen des Phagen gebildet, die als reife Partikel nachgewiesen werden können, wenn während kurzer Zeit bei 34°C ein später, natürlicherweise temperaturempfindlicher Schritt der Phagen-Morphopoiese abgelaufen ist.

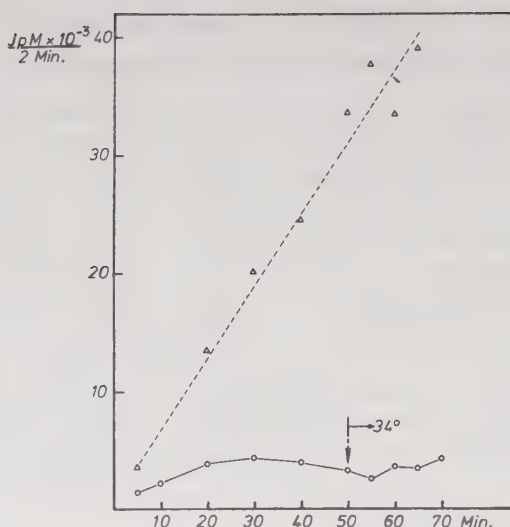
Die bisherigen Experimente haben nicht nur die Unabhängigkeit der Phagenreplikation von der in der Bakterienmutante defekten Initiationsfunktion nachgewiesen, ihre Daten ermöglichen zugleich eine Versuchsanordnung, bei der zum Zeitpunkt der Phageninfektion und während der Phagengesteuerten DNS-Synthese keine bakterielle DNS-Replikation abläuft. Die Analyse eines Phagenlysats, das in einer solchen Versuchsanordnung vermehrt wurde, kann zeigen, ob die bakterielle DNS der Gruppen "schwerer" und "superschwerer" t.P. tatsächlich das Produkt einer Phagen-kontrollierten DNS-Synthese ist. Dabei läßt die Untersuchung von transduzierenden Partikeln aus unterschiedlichen Chromosomenbereichen gewisse Rückschlüsse auf die Art der abgelaufenen Replikation zu.

c) Nachweis einer Phagen-kontrollierten Replikation
bakterieller DNS in der Bakterienmutante TB 37

Es war das Ziel der im Folgenden zu beschreibenden Versuche, dichtemarkierte Lysate von HT 12/4 zu analysieren, die in TB 37 unter den für die bakterielle Replikation nicht permissiven Bedingungen vermehrt wurden. Der Anteil an "schweren" und "superschweren" t.P. in solchen Lysaten sollte dann mit dem Anteil dieser Partikelklassen in einem bei 34°C gezogenen Lysat verglichen werden. Nach den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente wurde bei der Vermehrung von T-BU-Lysaten (siehe auch Mat. u. Meth.) in 42°C das folgende Versuchsprotokoll eingehalten:

TB 37-Zellen werden in TCG-20-Medium bei 34°C unter Belüftung bis zu einem Titer von ca. 1×10^8 Zellen/ml vermehrt. Dann wird die Kultur für 1 Stunde in 42°C überführt. In dieser Zeit kommt die bakterielle Chromosomenreplikation zum Stillstand. Dann erfolgt die Infektion mit HT 12/4 ($\text{moi}=10$). Nach 3 Minuten Adsorptionszeit werden die Zellen auf einem Membranfilter gesammelt, mit vorgewärmtem TCG (ohne Thymidin) gewaschen und in vorgewärmtes BU-Medium überführt. Nach 50 Minuten Belüftung bei 42°C wird die Kultur in 34°C überführt und nach weiteren 20 Minuten Belüftung chloroformiert. Das "permissive" Lysat wird in der gleichen Weise - aber durchgehend bei 34°C - vermehrt.

Ein zur Kontrolle vorgenommenes Pulsmarkierungsexperiment kann noch einmal die unter diesen Versuchsbedingungen ablaufenden DNS-Synthesen veranschaulichen. Der Versuchsablauf war mit dem oben geschilderten identisch, nur wurden die



Figur 13

^3H -Thymidin-Einbauraten uninfizierter Zellen von TB 37 nach dem Resuspendieren der auf einem Filter gesammelten Zellen in vorgewärmtem TCG-2-Medium. (Siehe Versuchsablauf S. 81/82)

--Δ--Δ--Δ-- bei 34°C belüftete Kultur

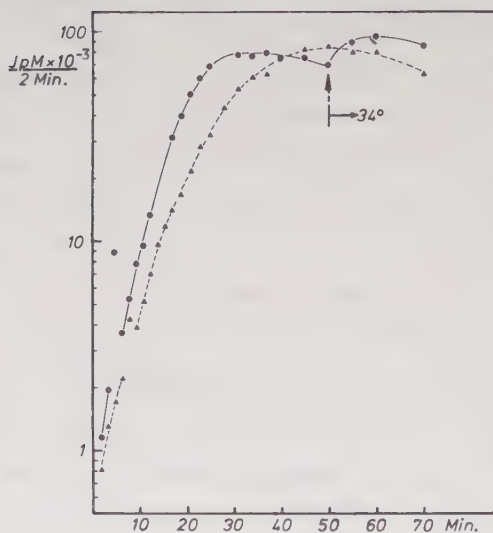
—○—○—○— bei 42°C belüftete Kultur, der Zeitpunkt der Überführung in 34°C ist markiert

Zellen (uninfiziert oder infiziert) nach dem Sammeln auf dem Filter nicht in BU-Medium, sondern in das bei Pulsexperimenten verwandte, nur mit 2 μg Thymidin/ml supplementierte TCG-2-Medium überführt.

Figur 13 zeigt den Verlauf der ^3H -Thymidin-Aufnahme durch uninfizierte Zellen. In der bei 34°C wachsenden Kultur

zeigt die Aufnahmerate nach Medienwechsel die ansteigende DNS-Syntheserate der wachsenden Kultur an. Bei 42°C bleibt die Einbaurrate nach einem geringen Anstieg (Adaptieren der Zellen an das neue Medium nach dem Waschen mit Thymidin-freiem Medium) auf einem niedrigen Niveau. Hier bewirkt der Übergang zur permissiven Temperatur nach 50 Minuten innerhalb von 20 Minuten keine signifikante Steigerung der Syntheserate, was die Angaben von Bagdasarian et al. bestätigt, die für die Neuinitiation der Chromosomenreplikation bei TB 37 nach Rückkehr in 34°C einen Zeitbedarf von ca. 30 Minuten angeben. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß unter diesen Versuchsbedingungen während des gesamten Phagenvermehrungszyklus' im Dichtemarkierungsmedium neben den Phagen-kontrollierten Synthesen kein meßbarer Anteil an DNS durch die bakterielle Chromosomenreplikation synthetisiert werden kann.

In Figur 14 (S. 84) ist der Radioaktivitätseinbau bei 34°C und 42°C nach vorangegangener Phageninfektion dargestellt. Beide Kurven verlaufen sehr ähnlich. Durch den Medienwechsel nach dem Sammeln der infizierten Zellen auf Filtern ist der für die Infektion bei 34°C typische Verlauf nicht zu beobachten (Fig. 8, S.64), sondern nur ein steiler Anstieg des Einbaus von Beginn der Markierung an. In beiden Fällen läßt sich nicht zwischen einem frühen und einem späteren Syntheseanstieg differenzieren, wenn man nicht die "Ein-Punkte-Ausrutscher"(?) in der 5. Minute bei 42°C und in der 8. Minute bei 34°C überbewerten will. Beim Übergang von 42°C nach 34°C in der 50. Minute kann ein leichter



Figur 14

³H-Thymidin-Einbauraten mit HT 12/4 infizierter Zellen nach dem Resuspendieren der auf Filtern gesammelten infizierten Zellen in TCG-2-Medium. (Versuchsprotokoll S. 81/82)

---▲---▲---▲--- bei 34°C belüftete Kultur

—●—●—●— bei 42°C belüftete Kultur, der Zeitpunkt der Überführung in 34°C ist markiert

Wiederanstieg des Einbaus beobachtet werden. Dieser Effekt einer Stimulierung des Einbaus beim Übergang von 42°C nach 34°C tritt auch nach Infektion von TB 98 auf, ist also eine phänotypische Ausprägung des Temperaturwechsels und unab-

hängig von dem temperatursensiblen Defekt der Mutante TB 37. Deshalb wurde eine Klärung der Bedeutung dieser Beobachtung und ihrer tieferen Ursachen nicht versucht. Diese Kurzzeitmarkierungsexperimente zeigen noch einmal den identischen Verlauf der Phagen-kontrollierten DNS-Synthese in der Bakterienmutante TB 37 bei 34°C und 42°C. Mit der Analyse von dichtemarkierten Lysaten, welche nach dem angegebenen Versuchsprotokoll vermehrt wurden, kann nun eine Fragestellung beantwortet werden, die sich anschaulich folgendermaßen formulieren läßt:

Repräsentiert der Anstieg der DNS-Syntheserate nach Phageninfektion ausschließlich die Replikation von Phagen-DNS, oder gibt es während der Phagenreplikation Vorgänge, die zu einer Synthese bakterieller DNS, unabhängig von der bakteriellen Chromosomenreplikation führen?

Zunächst wurden in TB 37 vermehrte ^3H -T-BU-Lysate von HT 12/4 nach Reinigung über einen Stufengradienten im CsCl-Dichtegradienten analysiert. In solchen Lysaten ist der Anteil an Tritium-Impulsen im Bereich mittlerer Dichte ein Maß für den Gesamtanteil "schwerer t.P." im Lysat. Die Untersuchung der Gruppe "schwerer t.P." auf die Häufigkeit des Auftretens von Markern aus unterschiedlichen Bereichen des Bakterienchromosoms sollte darüber hinaus Auskunft geben können, ob bestimmte Chromosomenabschnitte nach Infektion bevorzugt repliziert wurden. Wenn in TB 37 bei 42°C nach Phageninfektion neue Replikationen am Origin oder einem anderen definierten Ort auf dem Chromosom gestartet werden können, so müßten bakterielle Marker in der Nähe dieses

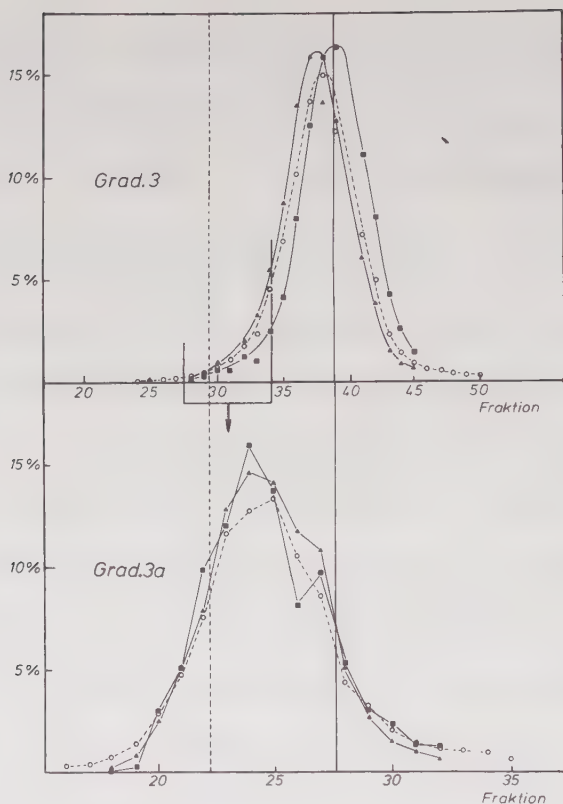
Ortes eher repliziert werden als weiter entfernte Marker. Dieser Gedankengang liegt auch einer Reihe von Experimenten zugrunde, die die sequentielle Replikation des Bakterienchromosoms nachwiesen und die Kartierung von Origin und Terminus der Replikation erlaubten (Caro und Berg, 1968; Nishioka und Eisenstark, 1970).

In den Figuren 15 und 16 (Grad. 3 und 4, S. 88/89) ist die Verteilung der Tritium-Impulse in den CsCl-Gradienten der unter permissiven (34°C) und nicht permissiven (42°C) Bedingungen gezogenen ^3H -T-BU-Lysate gezeigt.⁺) Die Dichte des als Referenz mitzentrifugierten H1 und das Maximum der Verteilung der i.P. des Lysats sind als senkrechte Linien eingetragen. Der Fraktionsabstand zwischen beiden Verteilungsmaxima entspricht beim 34°C -Lysat (Fig. 15) einer Dichtedifferenz von $\Delta\rho = 0,013 \text{ g/cm}^3$ und beim 42°C -Lysat einer solchen von $\Delta\rho = 0,011 \text{ g/cm}^3$. In den Figuren ist außerdem die zusätzlich getestete Verteilung der t.P. für die Marker pyr E (Empfänger: SA 624 (P22)) und leu A (Empfänger: SA 4 (P22)) wiedergegeben. Bedingt durch den unterschiedlichen G+C-Anteil in dem Fragment bakterieller DNS liegen die Verteilungsgipfel dieser t.P. bei unterschiedlichen Dichten. Zwischen beiden Gradienten sind keine

⁺) In einem anderen Experiment wurde auch ein bei 42°C in TB 98 vermehrtes Lysat analysiert. In allen getesteten Parametern - Dichte und Menge der t.P., relativer Anteil an "schweren t.P." - stimmte dieses Lysat mit dem bei 34°C gezogenen überein. Ein signifikanter Einfluß der Temperatur allein auf die Replikation bakterieller DNS nach Phageninfektion oder auf die Bildung transduzierender Partikel konnte damit ausgeschlossen werden. In den folgenden Experimenten wird als die für die bakterielle Replikation permissive Kontrolle immer das bei 34°C in TB37 gezogene Lysat analysiert.

signifikanten Unterschiede in den getesteten Verteilungsverläufen zu erkennen. Die Summe der Tritium-Impulse und t.P. in den Fraktionen der Gradienten ist in Tabelle 1 (Seite 90) wiedergegeben.

Die gekennzeichneten Fraktionen des dichteren Bereichs der Verteilung der t.P. wurden in beiden Gradienten zusammengefaßt und die Dichte der Partikel in einem zweiten Lauf analysiert (Gradienten 3a und 4a). Die Verteilungsverläufe zeigen deutlich, daß in beiden Gradienten ein hoher Anteil an "schweren t.P." vorhanden ist. Berücksichtigt man in beiden Gradienten nur die Fraktionen höherer Dichte (etwa bis zur mittleren Dichte zwischen Referenz und vollständig markierten i.P.), so läßt sich der Anteil der Menge "schwerer t.P." an der Gesamtheit der im ersten Gradienten bestimmten Partikelmenge recht gut abschätzen. Tabelle 1 zeigt, daß bei den getesteten Partikelgruppen die relativen Anteile der "schweren t.P." - mit nach Infektion replizierter bakterieller DNS - an der Gesamtmenge beider kompletter Lysate recht gut übereinstimmen. So demonstriert die Verteilung der Tritium-Impulse im zweiten Gradienten, daß ein Teil der bakteriellen DNS - unabhängig von einer bakteriellen Chromosomenreplikation während der Phagenvermehrung - nach Phageninfektion repliziert wird. Die für beide Lysate gut übereinstimmenden relativen Anteile an "schweren t.P." für zwei unterschiedliche bakterielle Marker machen es wahrscheinlich, daß diese Replikation bakterieller DNS nicht durch eine Phagen-kontrollierte Initiation am ursprünglichen Origin gestartet wird.



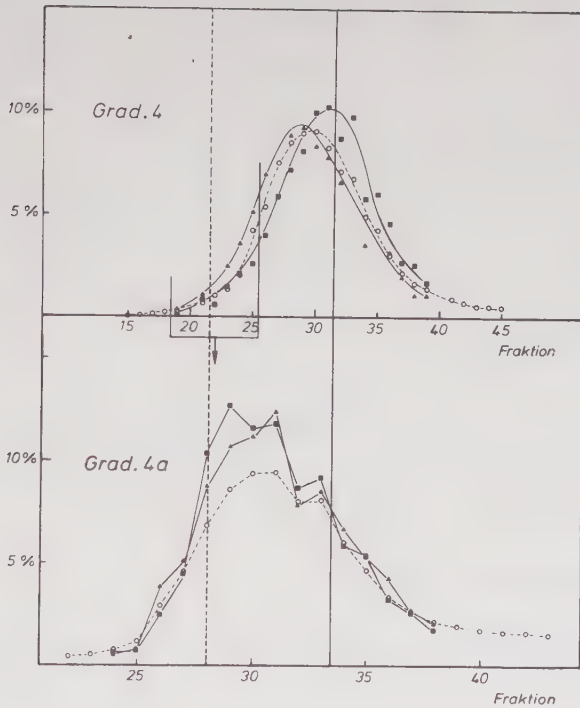
Figur 15: Gradient 3 und 3a

Gradient 3 : CsCl-Dichtegradientenanalyse eines bei 34°C in TB 37 gezogenen ^3H -T-BU-Lysats von HT 12/4 in einem 11ml-Gradienten (84 Fraktionen).

Gradient 3a : Analyse der im Gradienten 3 gekennzeichneten Fraktionen in einem 3,5 ml-Gradienten (67 Fraktionen).

Dargestellt ist die Verteilung der Tritium-Impulse (Messung von 0,05 ml Aliquots der Frakt. in Instagel), der pyr^+ -t.P. und der leu^+ -t.P.. Die durchgezogene senkr. Linie markiert die Position der Dichtereferenz (H1), die gebrochene das Verteilungsmaximum der i.P. des Lysats.

--○--○--○-- ^3H -Impulse; —■—■—■— pyr^+ -t.P.
(Empfänger: SA 624 (P22))
—▲—▲—▲— leu^+ -t.P.
(Empfänger: SA 4 (P22))



Figur 16: Gradient 4 und 4a

Gradient 4 : CsCl-Dichtegradientenanalyse eines bei 42°C in TB 37 gezogenen ^3H -T-BU-Lysats von HT 12/4 in einem 11 ml-Gradienten (86 Fraktionen).

Gradient 4a : Analyse der im Gradienten 4 gekennzeichneten Fraktionen im dichteren Bereich der Verteilung in einem 3,5 ml-Gradienten (69 Fraktionen).

Zur Vermehrung des Lysats bei 42°C siehe Seite 81.

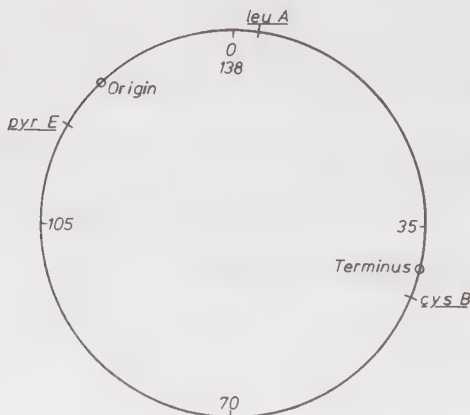
Darstellung der Verteilungen wie in Figur 15 (S. 88)

Gradient	leu ⁺ -t.P.	pyr ⁺ -t.P.	³ H-Impulse
3 (34°C)	3,85 x 10 ⁶	3,38 x 10 ⁶	320 000
3a (Fraktionen 18 - 24) x 2	1,7 x 10 ⁵ (4,4%)	4,4 x 10 ⁴ (1,3%)	10 300 (3,2%)
4 (42°C)	2,97 x 10 ⁶	2,84 x 10 ⁶	425 000
4a (Fraktionen 24 - 30) x 2	1,3 x 10 ⁵ (4,4%)	4,5 x 10 ⁴ (1,6%)	8 300 (2,0%)

Tabelle 1

Anzahlen an Tritium-Impulsen und t.P. in den Fraktionen der Gradienten von ³H-T-BU-Lysaten.

Abbildung 4 zeigt die Position der in transduzierenden Partikeln getesteten Marker auf der in 138 Minuten (Transferzeit bei Konjugation) eingeteilten Chromosomenkarte von *Salmonella typhimurium* (Sanderson, 1972). Die durch Nishioka



und Eisenstark (1970) als Origin und Terminus der bidirektionalen Replikation kartierten Chromosomenorte sind ebenfalls eingetragen.

Abbildung 4

Aus den Daten von beiden Gradienten ist übereinstimmend ein geringerer relativer Anteil an "schweren t.P." für den Origin-näheren Marker pyr E als für den weiter entfernten Marker leu A abzuleiten. Dieses Ergebnis mag allerdings teilweise mit dem experimentellen Verfahren der erneuten Zentrifugation der Fraktionen höherer Dichte zusammenhängen und hier durch die recht unterschiedlichen Dichten der Hauptgruppen dieser t.P. beeinflusst sein. Jedenfalls läßt sich aus den Daten keine bevorzugte Replikation des pyr E-Markers ablesen, wie es bei einer nach Phageninfektion am Origin startenden Chromosomenreplikation erwartet werden müßte.

Auch in früheren Gradienten war gezeigt worden, daß "schwere t.P." für die dort untersuchten Marker in vergleichbarer Häufigkeit auftreten, wenn die Phageninfektion bei Bakterien erfolgt, in denen die bakterielle Chromosomenreplikation abläuft. Dabei sind zum Zeitpunkt der Infektion die Replikationsorte statistisch über das Chromosom verteilt, und es schien denkbar, daß die Fortsetzung dieser Replikation nach Infektion zu der neu replizierten DNS der "schweren t.P." führte. Unter den nicht permissiven Bedingungen für die Initiation der bakteriellen Replikation in der Mutante TB 37 ist in allen Bakterien die Replikation am Terminus gestoppt und hier zeigt die Analyse das gleiche Ausmaß der Replikation bakterieller Chromosomenbereiche nach Phageninfektion an, wie bei der Infektion unter permissiven Bedingungen. Diese DNS-Replikation ist also ein Phagen-kontrollierter Vorgang, wobei die bisherigen Beobachtungen auch

deutlich auf einen von der bakteriellen Chromosomenreplikation verschiedenen Mechanismus hinweisen.

Es gibt allerdings noch Argumente, die diese letzte Feststellung etwas relativieren können:

- Die Unterschiede in der Entfernung der hier untersuchten Bakterien-Marker vom Origin mögen zu gering sein, um ein unterschiedliches Ausmaß an Replikation dieser Chromosomenbereiche nach Neu-Initiation hervorzurufen. Nach Phageninfektion mag die Zeit ausreichen, um - am ursprünglichen Origin startend - große Bereiche des gesamten Chromosoms einmal zu replizieren.
- Die Phagen-kontrollierte Replikation des Bakterienchromosoms mag an einem anderen Ort starten, als dem von Nishioka und Eisenstark (1970) kartierten Origin. Dieser Ort könnte von den untersuchten Markern etwa gleich weit entfernt sein (oder näher an leu A liegen).

Bei der Analyse der T-BU-Lysate war nun eine dritte Gruppe transduzierender Partikel entdeckt worden, deren bakterielle DNS komplett (in beiden Strängen) nach Phageninfektion synthetisiert wurde. Wenn eine Phagen-kontrollierte Replikation des gesamten Chromosoms abläuft, die nur an einem Ort (dem Origin oder einem anderen, Phagen-spezifischen) gestartet werden kann, so erscheint es aus zeitlichen Gründen allenfalls möglich, daß während der Phagenvermehrung und -reifung diesem Startpunkt besonders nahe Bereiche des Chromosoms bei diesem Vorgang zweimal repliziert werden. Bei Markern unterschiedlicher Position muß dann der Anteil in der Klasse der "superschweren t.P." einen vom Replikations-

startpunkt abhängigen extremen Häufigkeitsgradienten aufweisen.

Im folgenden Experiment wurden bei 34°C und 42°C in TB 37 nach dem beschriebenen Protokoll gezogene T-BU-Lysate auf das Vorhandensein und die relative Menge an "superschweren t.P." untersucht. Im BU-Dichtemarkierungsmedium wurde die Konzentration an Desoxyadenosin auf 70 µg/ml erniedrigt. Es hatte sich bei der Vermehrung der ³H-T-BU-Lysate und der ersten T-BU-Lysate gezeigt, daß es schwierig ist, mit TB 37 in diesem Medium genügend hochtitrige Lysate zu erhalten. Khandekar und Ramanand (1972) geben auch eine Hemmung der Thymidin-Aufnahme durch eine zu hohe Desoxyadenosin-Konzentration (über 3×10^{-4} M) an.

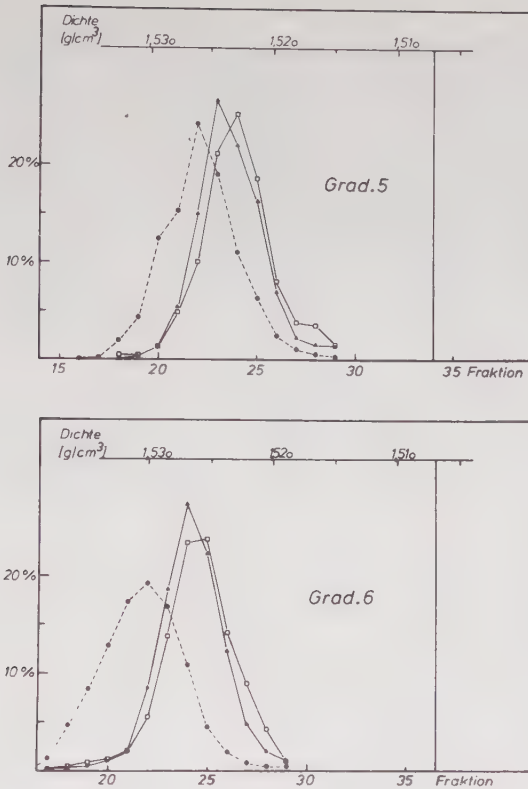
Je 10 ml eines bei 34°C und eines bei 42°C in TB 37 vermehrten T-BU-Lysats wurden zunächst im 30 ml-Gradienten zentrifugiert. In diesem und den folgenden Gradienten wurde die Verteilung der t.P. für die Marker leu A (Empfänger SA 4 (P22)) und cys B (Empfänger SU 687 (P22)) getestet (siehe Abb. 4, S.90). In der eingangs der Arbeit und bei den ³H-T-BU-Lysaten geschilderten Weise wurden die Fraktionen des dichteren Bereichs der Verteilung zusammengefaßt und in einem weiteren Gradienten analysiert. Dann wurde das Verfahren wiederholt, um in dem dritten Gradienten eine einheitliche Präparation "superschwerer t.P." analysieren zu können. Es wurde bei dem Verfahren immer darauf geachtet, daß von beiden Lysaten die Fraktionen des gleichen Dichtebereichs mit jeweils etwa demselben Anteil an t.P. im nächsten Gradienten analysiert wurden.

In Figur 17 (folg. Seite) sind die Verteilungen der in den dritten Gradienten (5 und 6) analysierten t.P. dargestellt. Die Übereinstimmung der Verteilungen zwischen beiden Gradienten ist vollkommen, wenn man die etwas unterschiedliche Dichtemarkierungsrate, die an der Dichte der i.P. ablesbar ist, berücksichtigt. In beiden Gradienten sind zweifelsfrei nur t.P. analysiert, die zur Gruppe der "superschweren t.P." gehören und annähernd die Dichte der vollständig markierten i.P. erreichen. Offensichtlich wurde in beiden Lysaten eine sehr gute Dichtemarkierung erzielt (durch Erniedrigen der Desoxyadenosin-Konzentration?), welche die gute Trennung der Partikel in den Gradienten erleichterte. Die Dichten der analysierten Partikelgruppen sind in Tabelle 2 (S.96) wiedergegeben. Es ist leicht zu erkennen, daß die Dichtemarkierung der t.P. übereinstimmend von der Markierungsrate (Substitution von Thyminbasen durch Bromuracil) im Lysat abhängt und die Markierungsverhältnisse exakt den Relationen entsprechen, die bei der ersten Beschreibung der "superschweren t.P." konstatiert wurden (S. 37ff.; der Marker leu A wird auf dem gleichen Fragment übertragen, wie der dort getestete Marker ara B).⁺)

⁺)Die Berechnung -siehe auch Fußnote Seite 40/41 - ergibt für die i.P. des ^{34}C -Lysats (Grad.5) eine Substitutionsrate von $X = 59\%$ und für die leu^+ -t.P. (molarer G+C-Anteil 0,53) eine solche von $X = 49\%$. Die Werte des ^{42}C -Lysats (Grad.6):

$$\text{i.P.: } X = 72\%, \quad \text{leu}^+\text{-t.P.: } X = 58\%$$

In allen Fällen werden also in der G+C-reicheren DNS der getesteten t.P. bei dieser Markierung die Thyminbasen nur mit ca. 80% der Effizienz ersetzt, wie in der Phagen-DNS der i.P..



Figur 17 : Gradient 5 und 6

CsCl-Dichtegradienten-Analysen von "superschweren t.P." aus T-BU-Lysaten von HT 12/4, die in TB 37 bei

34°C (Gradient 5 ; 85 Fraktionen) und bei

42°C (Gradient 6 ; 80 Fraktionen) gezogen wurden

(3,5 ml-Gradienten). Die analysierten Partikel wurden aus zwei aufeinanderfolgenden Gradienten durch Zentrifugation der Fraktionen des jeweils dichteren Bereichs der Verteilungen gewonnen, wie im Text beschrieben (S. 93).

—▲—▲—▲— leu⁺-t.P.; —□—□—□— cys⁺-t.P.
 ---●---●---●--- i.P. des Lysats

Die Dichte des mitzentrifugierten Referenzphagen H1 ist als senkrechte Linie bei 1.507 g/cm³ markiert.

Gradient :	5 (34°C)	6 (42°C)
Dichte der i.P.	1,526 g/cm ³	1,530 g/cm ³
Dichte der leu ⁺ -t.P.	1,524 g/cm ³	1,527 g/cm ³
Dichte der cys ⁺ -t.P.	1,523 g/cm ³	1,526 g/cm ³
Summe der leu ⁺ -t.P.	10 800	13 500
Summe der cys ⁺ -t.P.	5 300	6 500
leu ⁺ /cys ⁺	2,04	2,08

Tabelle 2

Partikeldichten und.- anzahlen aus den Gradienten 5 und 6

In der Tabelle sind auch die Anzahlen an "superschweren t.P." in den Gradienten wiedergegeben. Das relative Mengenverhältnis zwischen den t.P. für beide Marker stimmt zwischen den Gradienten 5 und 6 überzeugend überein. Bedingt durch die geringfügig unterschiedliche Dichte bei der Klassen transduzierender Partikel und das in den Gradienten angewandte Verfahren der Selektion von Fraktionen höherer Dichte mag dieses Verhältnis nicht exakt dem im kompletten Lysat entsprechen. Weil aber die Prozedur für beide Lysate die gleiche war, muß aus der Übereinstimmung der Mengenrelationen in diesen Gradienten auch auf ihre Übereinstimmung in den kompletten Lysaten geschlossen werden. Damit kann auch aus dieser Analyse von "superschweren t.P." - mit vollständig neusynthetisierter DNS aus weit voneinander getrennten Chromosomenbereichen - keine Bevorzugung einer Chromosomenregion bei der Phagen-kontrollierten Replikation bakterieller DNS erkannt werden. Eine zum Zeitpunkt der Phageninfektion ablaufende bakterielle Chro-

mosomenreplikation ist ohne Bedeutung für die Synthese der DNS der Klassen "schwerer" und "superschwerer" t.P..

Diese Untersuchungen sprechen übereinstimmend gegen eine an einem Ort des Bakterienchromosoms gestartete und sequentiell am intakten Chromosom verlaufende Replikation bakterieller DNS nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion. Bei dieser Phagen-kontrollierten Synthese bakterieller DNS muß ein Mechanismus vorliegen, bei dem der Initiationsvorgang nicht an einen bestimmten Ort auf dem Bakterienchromosom gebunden ist.

D. D I S K U S S I O N

Ausgangspunkt der hier vorgelegten Arbeit war die Frage nach Struktur und Herkunft des DNS-Moleküls einer kleinen Gruppe transduzierender Partikel, die im dichtemarkierten T-BU-Lysat als diskrete Gruppe höherer Dichte nachgewiesen werden kann. Schon in meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, daß diese "schweren t.P." den gleichen Anteil bakterieller Information enthalten wie die Hauptgruppe, und daß eine dritte Gruppe "superschwerer t.P." existiert. Eine Dichtegradientenanalyse der DNS der "schweren t.P." bestätigte dann überzeugend die aus den Dichten dieser Partikelklassen einfach abzuleitende Hypothese, daß ihre bakterielle DNS nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion semikonservativ repliziert wurde.

Damit hatte sich eine Modellvorstellung als falsch erwiesen, die für das Molekül der "schweren t.P." eine Struktur mit mehr als 50% Phagen-DNS und einem entsprechend verringerten Anteil an bakterieller DNS postulierte. Dieses Modell war in Anlehnung an Schmiegiers "Rekombinationsmodell" formuliert worden, welches auf dem Nachweis eines geringen Anteils (ca. 10%) an Phagen-spezifischer DNS in der Struktur der DNS-Moleküle allgemein transduzierender Partikel von P22 beruht. Eine Bestätigung dieser Vorstellungen hätte auch - über die Analogie zu Beobachtungen an speziell transduzierenden Partikeln beim Phagen Lambda - Ähnlichkeiten im Prozeß der Bildung transduzierender DNS-Moleküle bei beiden Phagen nahegelegt (Ozeki und Ikeda, 1968). Tatsächlich lieferten meine Experimente kaum neue

Informationen über die Struktur des DNS-Moleküls der Hauptgruppe allgemein transduzierender Partikel von P22, die Rückschlüsse auf den Mechanismus ihrer Entstehung gestattet hätten. Allerdings sind alle Ergebnisse der Dichtegradienten mit Schmieggers Modell vereinbar (wie in Abb. 2, S. 39 angedeutet), und es läßt sich aus den Dichten der "schweren t.P." sogar eine leichte Stützung dafür ableiten. Für diese Gruppe werden nämlich geringfügig höhere Dichten beobachtet, als für Partikel mit genau einem Strang neureplizierter bakterieller DNS zu erwarten ist.

Nun stützen die meisten der über allgemein transduzierende Partikel verfügbaren Daten eine Modellvorstellung, nach der bei der Bildung von DNS-Fragmenten Phagen-spezifischer Länge ein einheitlicher Mechanismus abläuft. Die Untersuchungen von Tye und Mitarbeitern (1974) über die begrenzte zirkuläre Permutation des Phagengenoms in den i.P. von P22 führten hier zu einer Modifizierung der durch Streisinger et al. (1967) formulierten "headful"-Hypothese:

Die Verpackung der von der Kapazität der Phagenhülle bestimmten Molekülgrößen startet ("Initiation der Verpackung") an einem fixierten Ort auf den Konkatemeren (Strukturen mehrfach aufeinanderfolgender P22-Genome) und schreitet sequentiell in einer Richtung fort.

Wenn die Fragmentierung des Bakterienchromosoms in die Moleküle allgemein transduzierender Partikel in gleicher Weise erfolgt, dann bietet dieser Mechanismus auch eine

plausible Erklärung für die seit langem bekannte Beobachtung, daß ein untersuchter bakterieller Marker in allen t.P. die gleiche Position auf dem DNS-Fragment - relativ zum Molekülende - innehat (Ozeki, 1959; Enomoto, 1967). Es gibt gute Hinweise dafür, daß bei den HT-Mutanten ein bei der Verpackung - möglicherweise bei ihrer "Initiation"-ablaufender Erkennungsprozeß in seiner Spezifität geändert ist. Daraus resultiert eine vom Wildtyp verschiedene Fragmentierung des Bakterienchromosoms wie auch der Vorstufen reifer Phagen-DNS (Schmieger und Backhaus, 1976; Chelala und Margolin ; Tye, 1976; Jackson, pers. Mitteilung).

Diese Vorstellungen, wie auch die Untersuchungen in unserem Labor über die Fragmentierung des Bakterienchromosoms bei der Reifung transduzierender Partikel, sind kaum mit einem Modell in Übereinstimmung zu bringen, das für die Bildung jedes transduzierenden Moleküls einen Rekombinationsprozeß zwischen Phagen- und Bakterien-DNS voraussetzt (Schmieger und Buch, 1975). Möglicherweise ist aber die Spezifität eines Erkennungsablaufs (Protein - DNS), der den Verpackungsvorgang an einem bestimmten Ort auf der DNS einleitet, an eine Sequenz gebunden, die vollständig nur einmal auf dem Phagengenom vorliegt. Dann wäre (im Wildtyp-Phagen) ein Rekombinationsprozeß Voraussetzung für die Initiation einer sequentiellen Verpackung von Bakterien-DNS-Bruchstücken. Jeweils das erste einer Folge verpackter Fragmente (z.B. in his^+ -t.P.) enthielte dann auch Phagen-spezifische Sequenzen.

Zuzugeben ist, daß bei diesen Vorstellungen etwas gewaltsam versucht wird, die nachgewiesene Beteiligung von Phagen-DNS an der Struktur des DNS-Moleküls allgemein transduzierender Partikel bei P22 mit dem modifizierten Streisinger-Modell in Übereinstimmung zu bringen. Weitere Untersuchungen werden mit neuen Methoden diese offenen Fragen klären müssen. Hier erscheinen besonders Versuchsansätze zur Phagen-Morphopoiese in vitro vielversprechend. In solchen Versuchen gelingt es beim Phagen Lambda, eine dem Ansatz von außen zugefügte reine DNS (hier: Bakteriophagen-DNS) in reifen Phagenpartikeln nachzuweisen (Kaiser und Masuda, 1973; Hohn et al., 1974).

Für den Mechanismus der Partikelbildung wirft nun die Entdeckung der Gruppen "schwerer" und "superschwerer" t.P. keine neuen Probleme auf. Denn eine nach dem Zeitpunkt der Phageninfektion neu replizierte bakterielle DNS, die in diesen Partikeln nachgewiesen wurde, kann natürlich in gleicher Weise Substrat des Partikelbildungsprozesses sein, wie die vor Infektion vorhandene Bakterien-DNS. Es war aber interessant, zu untersuchen, welcher Kontrolle die DNS-Replikation unterliegt, die diese bakterielle DNS synthetisiert. Verschiedene Daten (in Abschnitt CII a ausführlich diskutiert) widersprachen nämlich der einfachsten und naheliegenden Annahme, diese DNS sei das Produkt einer nach Phageninfektion fortgesetzten Bakterien-gesteuerten DNS-Synthese.

Die Dichten der t.P. des BU-BU-Lysats zeigen an, daß während der Replikation ihrer DNS unterschiedliche Anteile an

Thymin durch Bromuracil ersetzt werden. Dieser Befund war ein erster positiver Hinweis auf die von der bakteriellen DNS-Synthese verschiedenen Replikationsbedingungen nach Phageninfektion. Infolge der Infektion wird eine für das natürliche Thymidin bestehende Selektivität in den Reaktionen, die zum Einbau der Nukleoside in die DNS führen, verringert⁺). Diese Verringerung der Selektivität könnte die Spezifität der Aufnahme der Nukleoside oder der Phosphorylierungs-Reaktionen (etwa der durch die Thymidin-Kinase katalysierten) zum Triphosphat betreffen, aber auch die Eigenschaft einer neuen oder veränderten Polymerase sein. Die Literatur gibt da keinen Hinweis: Bei Untersuchungen der Thymidin-Kinase aus *Escherichia coli* hat sich gezeigt, daß dieses allosterisch regulierbare Enzym Bromdesoxyuridin ebenso effizient umsetzen kann wie Thymidin, und auch im in vitro-System mit der Polymerase I von *E. coli* kann Bromdesoxyuridintriphosphat das Thymidintriphosphat praktisch vollständig ersetzen (Okazaki und Kornberg, 1964; Iwatsuki und Okazaki, 1967; Bessman et al., 1958). Bei in vivo durchgeführten Versuchen ist es prinzipiell schwierig zwischen diesen Alternativen zu unterscheiden.

Am Verteilungsverlauf der his^+ -t.P. im ersten Gradienten des BU-BU-Lysats (Grad. 2, Fig.7, S. 54) ist noch auffal-

⁺) In unserem Markierungsmedium wird neben Bromdesoxyuridin (5 $\mu\text{g/ml}$) auch etwas Thymidin (1 $\mu\text{g/ml}$) angeboten. Die im allgemeinen nach Phageninfektion erreichte Markierungsrate liegt bei etwa 40% (siehe S. 32). Die nach diesem Zeitpunkt synthetisierte DNS enthält also neben Bromuracil noch überwiegend Thymin, obwohl dieses im Medium nur in 16,7% der Nukleoside enthalten ist.

lend, daß hier offensichtlich der Anteil der Gruppen "schwerer" und "superschwerer" t.P. an der Gesamt-Transduktionsaktivität deutlich höher ist (ca.30%), als im T-BU-Lysat (ca.10%). Das kann an der in einem solchen Lysat durch den BU-Einbau in die bakterielle DNS bedingten geringeren Transduktionsfähigkeit liegen ⁺). Es ist aber auch möglich, daß an einer BU-markierten DNS - die im BU-BU-Lysat schon vor dem Zeitpunkt der Phageninfektion vorliegt - bakterielle Replikationen an neuen Orten gestartet werden können. Die Stimulierung solch unspezifischer Initiationen der DNS-Replikation durch BU-markierte DNS ist diskutiert worden, wenn auch einige Experimente gegen diese Hypothese sprechen (Eberle, 1968; Chan und Lark, 1969). Allerdings konnten Lin und Riggs (1972) zeigen, daß die Bindung des lac-Repressors an die lac-Operator-DNS bei der Substitution der Thyminbasen durch Bromuracil drastisch geändert wird. Nach dieser Beobachtung läßt sich nicht ausschließen, daß eine BU-Markierung auch die Signale der DNS-Replikation beeinflusst. Die Möglichkeit unspezifischer Initiationen macht natürlich auch einige der in Abschnitt IIa angeführten Argumente gegen eine Synthese der DNS der "superschweren t.P." durch den bakteriellen Replikationsapparat weniger überzeugend,

⁺) Schmieger (1968) gibt tatsächlich für das BU-BU-Lysat eine im Mittel um den Faktor 3 gegenüber dem T-BU-Lysat niedrigere Transduktionshäufigkeit an. Die Daten meiner Experimente bestätigen in der Tendenz diese Aussage, nur war der Effekt wesentlich geringer (Faktor 1,2). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Bestimmung von Transduktionshäufigkeiten in Abhängigkeit von Lysat und Empfängerkultur starken Schwankungen unterworfen ist.

weil diese Argumente auf dem koordinierten sequentiellen Ablauf der bakteriellen Replikationsrunden beruhten.

Das Hauptziel der im folgenden Abschnitt C.II.b beschriebenen Experimente war es, eine Versuchsanordnung zu entwickeln, welche die Replikation des Phagen auch dann erlaubt, wenn in den Wirtsbakterien zum Zeitpunkt der Phageninfektion keine DNS-Replikation abläuft. In der Mutante TB 37, die einen temperatursensiblen Defekt (dna A_{ts}) in der Initiation der DNS-Replikation besitzt, dauert es ca. 50 Minuten in der nicht permissiven Temperatur, bis die bakterielle DNS-Synthese durch das Beenden der bereits gestarteten Replikationsrunden vollständig zum Stillstand kommt. Wird zu diesem Zeitpunkt die Infektion mit P22 durchgeführt, so läßt sich der Phagen-gesteuerte DNS-Syntheseverlauf in Puls-Markierungsexperimenten verfolgen. Eine Reprimierung bakterieller Replikationsvorgänge, die sonst das Versuchsergebnis überlagert, spielt hier keine Rolle. Nach Infektion mit c2-Phagenmutanten (HT 12/4) und dem Wildtyp von P22 ergibt sich in diesen Versuchen kein Hinweis, daß der für P22 typische Ablauf der DNS-Synthese durch den Defekt der Bakterienmutante beeinflußt wird. Am überzeugendsten wird schließlich die Unabhängigkeit der Phagenentwicklung von dem in TB 37 bei höherer Temperatur defekten Protein durch den Nachweis einer normalen Partikelbildung bei 42°C demonstriert.

Die Aussagen dieser Experimente stimmen gut mit denen entsprechender Untersuchungen bei Bakteriophagen von Escheri-

chia coli überein. Die Replikation aller bisher untersuchten temperenten oder virulenten Phagen ist dort in vivo von der Funktion 'des dna A-Genprodukts unabhängig (Lanka und Schuster, 1970; Beyersmann und Schuster, 1971; Manheimer und Truffaut, 1974; Toussaint und Faalen, 1974). Auch die in vitro-Systeme der DNS-Replikation mit der einzelsträngigen DNS der Phagen Ø X174 und M13 als Substrat scheinen das dna A-Protein nicht zu benötigen, wenn hier auch widersprechende Ergebnisse vorliegen (Schekman et al., 1972; Wickner und Hurwitz, 1974; Schekman et al. 1974). Es ist vollständig unbekannt, welche Funktion dieses Protein bei der Initiation des bakteriellen Replikationszyklus' ausübt. Übereinstimmend wird für die Mutanten von Salmonella und E. coli ein Zusammenhang mit geänderten Eigenschaften der bakteriellen Membran beschrieben (Bagdasarian et al., 1972; Shapiro et al., 1970).

Über die Abhängigkeit der Replikation des P22-Genoms von anderen Wirtsfunktionen lassen sich noch keine Aussagen machen, weil für Salmonella typhimurium nicht das gleiche Spektrum gut charakterisierter konditional letaler (dna_{ts}) Mutanten wie bei Escherichia coli existiert. Das recht aufwendige Verfahren der Isolierung neuer Mutanten scheint lohnend und wurde in unserem Labor in Angriff genommen (Schwarz, 1975). Die Mutante von Spratt und Rowbury (dna C, 1970; Shannon und Rowbury, 1972) stand uns leider nicht zur Verfügung. In einem Salmonella-Stamm mit defekter Polymerase I (3007, Whitfield und Levine, 1973) wurde die Vermehrung von P22 in ersten Vorexperimenten getestet. Es

zeigte sich, daß die in diesem Stamm ausgefallene Funktion der Polymerase I für die Replikation des Phagen nicht erforderlich ist und die Zellen eine ähnlich hohe Zahl an Phagennachkommen freisetzen, wie der Wildtyp. Auffallend ist aber, daß hier die Phagenentwicklung gegenüber der Vermehrung im Wildtyp deutlich verzögert abläuft und die ersten reifen Phagen ca. 10 Minuten später entstehen. Phagen mit ausgefallener Rekombinationsfunktion (erf⁻, Yamagami und Yamamoto, 1970; Botstein und Matz, 1970), die in rec⁻-Bakterien nicht zur Vermehrung kommen, werden auch in diesem Stamm nicht repliziert. Möglicherweise kann also eine Funktion der Polymerase I bei der P22-Replikation durch Phagen-codierte Proteine, wie z.B. das erf-Produkt, substituiert werden.

Nun sind *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* nahe miteinander verwandt und besitzen weitgehend übereinstimmende genetische Karten (Sanderson, 1972). P22 kann trotz seiner Unfähigkeit, an die Zellen zu adsorbieren und sie zu infizieren, in *E. coli* zur Vermehrung gebracht werden, womit es prinzipiell möglich ist, seine Abhängigkeit von den hier bekannten Replikationsfunktionen zu testen. Es sind verschiedene Versuchsansätze denkbar, das P22-Genom in *E. coli* zu bringen:

- Konstruktion P22-sensitiver *E. coli*-Stämme (über *Salmonella*-*E. coli*-Hybride, Baron et al., 1968)
- Transfektion von *E. coli* mit P22-DNS (Benzinger und Kleber, 1971)
- Übertragung mittels Konjugation aus *Salmonella*-Stämmen,

die das P22-Genom als Prophagen enthalten (Botstein und Herskowitz, 1974)

Bei uns wird zur Zeit die dritte Möglichkeit mit ersten Erfolgen durchgeführt.

Bei allen Untersuchungen wird auch der Vergleich des Replikationsmodus' von P22 mit den Vorgängen bei der Lambda-Replikation aufschlußreich sein, weil bei diesem Phagen die bei vegetativer Vermehrung oder Lysogenisierung wirksamen Gene in Funktion und Position auf dem Genom den entsprechenden Genen bei P22 so weitgehend homolog sind, daß sie zwischen beiden Phagen ausgetauscht werden können (Botstein und Herskowitz, 1974; Hilliker und Botstein, 1975). Dieser Befund suggeriert auch eine Übereinstimmung des Replikationsablaufs, die aber mit den bisher bekannten Daten nicht ausreichend belegt werden kann ⁺).

In den in Abschnitt II.b beschriebenen Versuchen habe ich den Verlauf der DNS-Synthese nach Phageninfektion über die Kurzzeit-(Puls-)Markierung säurefällbaren Materials mit ³H-Thymidin verfolgt. Weil Thymidin hier ausschließlich

⁺) Bei Lambda sind einige der Bakterien- und Phagen-codierten Funktionen bekannt, die für eine frühe Replikation der zirkularisierten Phagen-DNS verantwortlich sind und die Initiation dieser Replikation an einem kartierten Origin, wie den Übergang zur späteren Sigma- (rolling circle-) Replikation steuern (Kaiser, 1971; Enquist und Skalka, 1973). Wegen ihrer verschiedenen Struktur unterliegt mindestens die Ringbildung der Phagen-DNS in der Zelle, welche Voraussetzung für Lysogenisierung und Replikation ist, bei P22 einem von Lambda verschiedenen Mechanismus. Die über die P22-Replikation verfügbaren Daten, wie auch die phänotypische Expression der Gene 12 und 18 - welche den für die Lambda-Replikation verantwortlichen Genen O und P homolog sind - enthalten keinen Widerspruch zu der Annahme des übereinstimmenden Replikationsablaufs bei beiden Phagen.

in die DNS eingebaut wird, kann die gemessene Einbaurate als indirektes Maß der DNS-Syntheserate benutzt werden. Die Aufnahme des Nukleosids und seine Phosphorylierung zum 5'-Triphosphat als direktem Baustein der DNS-Synthese gehen als Parameter in die Versuchsaussage ein. Änderungen der Spezifitäten und Kinetiken der für diese Vorgänge verantwortlichen Reaktionen (etwa in Folge der Phageninfektion) mögen einen signifikanten Einfluß auf die Relation zwischen Radioaktivitätseinbau und Syntheserate haben. Die in meinen Versuchen getesteten Stämme sind Mutanten, welche für die DNS-Synthese auf die Aufnahme des im Medium angebotenen Thymidins angewiesen sind. Smith und Levine (1964) verwenden Wildtypzellen, die dieses Nukleosid selbst synthetisieren können, und messen in den Pulsen die kurzfristige Aufnahme und den Einbau des Nukleosids. Dadurch mag ihre Methode auch empfindlicher auf eine Änderung der an dem Einbau im Medium angebotenen Thymidins beteiligten Reaktionen reagieren. Die Nicht-Übereinstimmung einzelner experimenteller Ergebnisse (siehe S. 71 ff.) könnte so teilweise in einem nach Phageninfektion geänderten Nukleotidstoffwechsel begründet sein. Es gibt einige Untersuchungen über Effekte einer P22-Infektion auf den DNS-Stoffwechsel der Zelle (Smith und Levine, 1965; Levine und Schott, 1971; Woodworth-Gutai et al., 1972; Israel et al., 1972). Aber für eine Beeinflussung des Nukleotidstoffwechsels, die bei virulenten Phagen und Eukaryonten-Viren bekannt ist (Koerner, 1970; Klemperer et al., 1967; Thouless und Chachda, 1976), gibt es bei P22 nur vage Hinweise (Khandekar und Ramanand, 1972; siehe auch Disk. S. 102). - Die angedeu-

teten Schwierigkeiten bei einer Interpretation von in vivo-Daten der DNS-Synthese ließen sich in - allerdings methodisch-technisch komplizierteren - Systemen umgehen, die die Triphosphate als direkte Vorstufen der DNS-Synthese einsetzen (Klein und Bonhoeffer, 1972; Cieřla et al., 1974).

Die aus den Pulsmarkierungs- und Temperatursprung-Experimenten gewonnenen Kenntnisse ermöglichten die Anordnung eines Versuchsablaufs, bei dem nach der Phageninfektion ausschließlich die Phagen-kontrollierte DNS-Synthese abläuft. Die Analyse der unter diesen Bedingungen gezogenen dichtemarkierten Lysate zeigte, daß diese Phagen-kontrollierte Synthese auch zur Replikation bakterieller DNS führt. Schließlich läßt sich (im Vergleich mit einem Lysat, das unter den für die bakterielle Replikation permissiven Bedingungen gezogen wurde) an dem relativen Anteil replizierter DNS (in t.P.) aus unterschiedlichen Chromosomenbereichen demonstrieren, daß diese Synthese nicht nach dem Modell der bakteriellen Chromosomenreplikation ablaufen kann. Besonders der Nachweis vollständig neusynthetisierter DNS aus weit voneinander entfernten Abschnitten des Chromosoms macht es sehr wahrscheinlich, daß die Initiation dieser Replikation unabhängig von einem eindeutig bestimmten Origin auf der Bakterien-DNS erfolgt. Für die Annahme, daß diese Replikation an Fragmenten der Bakterien-DNS ablaufen kann, spricht schließlich der Befund, daß spätestens 40 Minuten nach Infektion die beginnende Fragmentierung des Bakterienchromosoms (zu den Molekülen der t.P.) mit allen Vorgängen am intakten Molekül konkurriert (Schmieger und Buch, 1975).

Über den Vorgang der Initiation einer Phagen-kontrollierten Replikation bakterieller DNS, wie über die Art der replikativen Strukturen, in denen sie abläuft, lassen sich bisher nur Vermutungen anstellen, die teilweise auf Analogieschlüssen zu Beobachtungen bei der genauer untersuchten Replikation anderer Phagen beruhen. - Auch bei der Replikation der Phagen-DNS ist die Initiation ein kontrollierter Vorgang, der an einen - kartierbaren - Origin auf der Phagen-DNS gebunden ist (Schnös und Inman, 1970; Stevens et al., 1971; Dressler et al., 1972). Die Frage, ob eine Synthese der bakteriellen DNS durch den Phagen auch an mehr oder weniger definierten Orten auf dem Bakterienchromosom gestartet werden kann, ist eine Frage nach der Spezifität dieses Initiationsprozesses. (Es läßt sich hier durchaus eine Analogie zu dem am Anfang diskutierten Problem der Spezifität des "Initiationsvorgangs" bei der sequentiellen Fragmentierung und Verpackung der bakteriellen DNS in t.P. sehen, bei dem es fraglich war, ob die für diesen Vorgang notwendigen Signale nur durch Phagen-eigene Sequenzen bereitgestellt werden können). Wenn nur das Vorliegen Phagen-spezifischer Sequenzen einen Phagen-kontrollierten Replikationsstart ermöglicht, dann müssen replikative Strukturen existieren, in denen bakterielle DNS durch einen Rekombinationsprozeß physikalisch mit dem Phagen-codierten Origin verbunden ist.

Bei einigen temperenten Bakteriophagen ist eine Kontrolle der Replikation von Bakterien-DNS in solchen Rekombinationsstrukturen, die ein neues Replikon bilden, bekannt. In anderen Fällen synthetisiert der Phage ein Protein, das

eine im Bakterium ausgefallene Elongationsfunktion substituieren kann (Yarmolinsky, 1975). Auch bei Eukaryontenviren sind ähnliche Prozesse beschrieben (St. Jeor et al., 1974; Graessmann und Gräessmann, 1976). Es war aber bisher unbekannt und ist etwas überraschend, daß auch nach lytischer Infektion durch den P22 Bakteriensequenzen unter Phagen-Kontrolle repliziert werden können, weil aus dem Ablauf einer solchen Infektion zunächst kein plausibler Mechanismus für diesen Vorgang abzuleiten ist. Vielleicht gibt aber der Phage Mu-1 ein Modellsystem ab für die Prozesse, die mit geringerer Wahrscheinlichkeit auch nach P22-Infektion ablaufen könnten. Bei diesem Bakteriophagen, dessen Genom an allen Orten des Bakterienchromosoms integrieren kann, wurden nach Infektion zirkuläre, wahrscheinlich replikative Strukturen nachgewiesen, die neben dem Phagenchromosom auch unterschiedliche Anteile an bakterieller DNS enthalten (Schroeder et al., 1974). Bei P22 wäre nach diesem Modell der Anteil der neu replizierten Bakterien-DNS limitiert durch die geringe Wahrscheinlichkeit mit der solche Replikationsstrukturen entstehen. (In dem einmal gebildeten "Replikon" sollte die Phagen-kontrollierte Replikation normal ablaufen können. Allerdings ist in allen Lysaten der Anteil an Partikeln mit vollständig neu replizierter Bakterien-DNS ("superschwere t.P.") mit ca. 2% signifikant geringer, als der Anteil an Partikeln, deren DNS nur einmal repliziert wurde ("schwere t.P.", ca. 10%)).

Die überzeugendsten Daten über eine Origin-spezifische Initiation der Phagen-DNS-Replikation sind aus der Analyse

elektronenoptischer Aufnahmen gewonnen (Lambda: Schnös und Inman, 1970; T7: Dressler et al., 1972). Sie erlauben allerdings kaum Aussagen über den Grad der Spezifität eines solchen Prozesses. Deshalb kann die Möglichkeit nicht prinzipiell ausgeschlossen werden, daß Phagen-codierte Funktionen die Replikation der bakteriellen DNS an mehr oder weniger spezifischen bakteriellen Sequenzen initiieren. Daß die folgende Replikation nicht unbedingt auf das Vorliegen von Ringstrukturen angewiesen ist, zeigt das Beispiel der am linearen Molekül ablaufenden T7-Replikation.

Die weiteren Untersuchungen dieser Probleme werden auch dadurch erschwert, daß der zu beobachtende Vorgang sich nur selten ereignet. Ein normalerweise für den Genetiker naheliegender Lösungsansatz scheint hier zum Scheitern verurteilt: Die Isolierung von Phagenmutanten, die diesen Prozeß häufiger durchführen könnten (also einen höheren Anteil an "schweren t.P." im Lysat enthielten), ist fast unmöglich, weil keine selektiven Techniken denkbar sind, und es auch schwierig sein dürfte, ein einfaches Verfahren zu entwickeln, nach solchen Mutanten zu suchen. Ein aussichtsreicherer Ansatz scheint die Suche nach replikativen Strukturen und ihre elektronenoptische Analyse zu sein. Auf eine denkbare Methode zur Isolierung solcher Strukturen weisen experimentelle Befunde von U. Buch hin (1974). Sie konnte zeigen, daß nach Phageninfektion wachsende Anteile bakterieller DNS in Fraktionen von Sucrosegradienten erscheinen, in denen bei der angewandten Methode des Zellaufschlusses auch Zwischenstufen der Phagenreplikation (von Botstein (1968)

Intermediate I genannt) nach ihrem Sedimentationsverhalten zu erwarten sind.

Für den aufmerksamen Leser kann es nun nicht verborgen geblieben sein, daß in meiner Arbeit die Beantwortung einiger Fragen viele neue Probleme aufgeworfen hat. Die Versuchsaussagen gaben den ursprünglichen Fragestellungen bald eine neue Richtung, die durch die Möglichkeit einer von der Chromosomenreplikation unabhängigen Synthese bakterieller DNS unter der Kontrolle des Phagen bestimmt wurde. Dabei lieferte die Verfolgung der Phagen-gesteuerten DNS-Synthese in der Bakterienmutante TB 37 hier in erster Linie nur notwendige experimentelle Voraussetzungen für die weiteren Untersuchungen. Gleichzeitig wurde aber deutlich, daß bei P22 noch viele Fragen offen sind, die die Beziehungen zwischen der Phagen-und Bakterien-gesteuerten DNS-Synthese, wie den Einfluß der Phageninfektion auf Nukleotid- und DNS-Stoffwechsel der Zelle betreffen. Offensichtlich muß auch die zentrale Beobachtung, daß die Phagenreplikation zu einer limitierten Synthese bakterieller DNS führt, noch genauer untersucht werden.

E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Adler, J.; B. Templeton

The amount of galactose genetic material in λ dg bacteriophage with different densities

J. Mol. Biol. 7, 710-720 (1963)

D'Ari, R.; A. Jaffe-Brachet; D. Touati-Schwartz; M.B. Yarmolinsky

A dna B analog specified by bacteriophage P1

J. Mol. Biol. 94, 341-366 (1975)

Bagdasarian, M.; M. Zdzienicka; M. Bagdasarian

Temperature sensitive initiation of DNA synthesis in a mutant of Salmonella typhimurium

Molec. Gen. Genet. 117, 129-142 (1972)

Bagdasarian, M.; M. Hryniewics; M. Zdzienicka; M. Bagdasarian

Integrative suppression of a dna A mutation in Salmonella typhimurium

Molec. Gen. Genet. 139, 213-231 (1975)

Baron, L. S.; P. Gemski; E. M. Johnson; J. A. Wohlhieter

Intergeneric bacterial matings

Bacteriol. Rev. 32, 362-369 (1968)

Benzinger, R.; I. Kleber

Transfection of Escherichia coli and Salmonella typhimurium spheroplasts: host-controlled restriction of infective bacteriophage P22 deoxyribonucleic acid

J. Virol. 8, 197-202 (1971)

Bessman, M. J.; I. R. Lehman; J. Adler; S. B. Zimmerman; E. S. Simms; A. Kornberg

Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. III. The incorporation of pyrimidine and purine analogues into deoxyribonucleic acid

Proc. Natl. Acad. Sci. US 44, 633-640 (1958)

Beyersmann, D.; M. Schlicht; H. Schuster

Temperature-sensitive initiation of DNA replication in a mutant of *Escherichia coli* K 12

Molec. Gen. Genet. 111, 145-158 (1971)

Beyersmann, D.; H. Schuster

DNA synthesis in P1 infected *E. coli* mutants temperature sensitive in DNA replication

Molec. Gen. Genet. 114, 173-176 (1971)

Beyersmann, D.; W. Messer; M. Schlicht

Mutants of *Escherichia coli* B/r defective in deoxyribonucleic acid initiation: dna I, a new gene for replication

J. Bacteriol. 118, 783-789 (1974)

Bird, R. E.; J. Louarn; J. Martuscelli; L. Caro

Origin and sequence of chromosome replication in *Escherichia coli*

J. Mol. Biol. 70, 549-566 (1972)

Botstein, D.

Synthesis and maturation of phage P22 DNA

I. Identification of intermediates

J. Mol. Biol. 34, 621-641 (1968)

Botstein, D.; M. J. Matz

A recombination function essential to the growth of bacteriophage P22

J. Mol. Biol. 54, 417-440 (1970)

Botstein, D.; I. Herskowitz

Properties of hybrids between *Salmonella* phage P22 and coliphage λ

Nature 251, 584-589 (1974)

Buch, U.

Die Fragmentierung der DNS von *Salmonella typhimurium* nach Infektion durch den Phagen P22 bei der Bildung transduzierender Partikel. Diplomarbeit, LMU München (1974)

Bukhari, A.; D. Zipser

Random insertion of Mu-1 DNA within a single gene

Nature 236, 240-243 (1972)

Cairns, J.

The bacterial chromosome and its manner of replication as
seen by autoradiography

J. Mol. Biol. 6, 208-213 (1963)

Cairns, J.; G.S. Stent; J. D. Watson eds.

Phage and the origins of molecular biology

Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1966)

Campbell, A.

Episomes

Advan. Genet. 11, 101-145 (1962)

Carl, P. L.

Escherichia coli mutants with temperature sensitive synthe-
sis of DNA

Molec. Gen. Genet. 109, 107-122 (1970)

Caro, L. G.; C. M. Berg

Chromosome replication in some strains of Escherichia coli
K 12

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 559-573 (1968)

Chan, H.; K. G. Lark

Chromosome replication in Salmonella typhimurium

J. Bacteriol. 97, 848-860 (1969)

Chelala, C. A.; P. Margolin

Specificity in formation of transducing particles
(im Druck)

Cieřla, Z.; K. Mardarowics; T. Klopotoski

Inhibition of DNA synthesis and cell division in Salmonella
typhimurium by acide

Molec. Gen. Genet. 135, 339-348 (1974)

Cooper, P. K.; P. C. Hanawalt

Heterogeneity of patch size in repair replicated DNA in
Escherichia coli

J. Mol. Biol. 67, 1-10 (1972)

Crick, F. H. C.; L. Barnett; S. Brenner; R. J. Watts-Tobin
General nature of the genetic code for proteins
Nature 192, 1227-1232 (1961)

Dawson, G. W. P.

The interpretation of data from transduction experiments
Gen. Res. Cambridge 4, 416-426 (1963)

Delbrück, M.; W. T. Bailey

Induced mutations in bacterial viruses
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 33-37 (1946)

O'Donovan, G. A.; J. Neuhaud

Pyrimidine metabolism in microorganisms
Bacteriol. Rev. 34, 278-343 (1970)

Dopatka, H. D.; H. H. Prell

Amber mutants of Salmonella phage P22 in genes engaged
in the establishment of lysogeny
Molec. Gen. Genet. 120, 157-170 (1973)

Dressler, D.

The recent excitement in the DNA growing point problem
Ann. Rev. Microbiol. 29, 525-559 (1975)

Dressler, D.; J. Wolfson; M. Magazin

Initiation and reinitiation of DNA synthesis during repli-
cation of bacteriophage T7
Proc. Natl. Acad. Sci. US 69, 998-1002 (1972)

Ebel-Tsipis, J.; D. Botstein; M. S. Fox

Generalized transduction by phage P22 in Salmonella typhi-
murium
J. Mol. Biol. 71, 433-448 (1972)

Eberle, H.

A comparison of (^{13}C -)glucose- $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ with 5-bromouracil
as density label in two experiments on sequential DNA
replication
J. Mol. Biol. 31, 149-152 (1968)

Eckhart, W.

Oncogenic Viruses

Ann. Rev. Biochem. 41, 503-516 (1972)

Enomoto, M.

Composition of chromosome fragments participating in phage P22-mediated transduction of Salmonella typhimurium

Virology 32, 474-482 (1967)

Enquist, L. W.; A. Skalka

Replication of bacteriophage λ DNA dependent on the function of host and viral genes

I. Interaction of red, gam and rec

J. Mol. Biol. 75, 185-212 (1973)

Fox, E.; M. Meselson

Unequal photosensitivity of the two strands of DNA of bacteriophage λ

J. Mol. Biol. 7, 583-589 (1963)

Freese, E.

The specific mutagenic effect of base analogues on phage T4

J. Mol. Biol. 1, 87-105 (1959)

Georgopoulos, C. P.; I. Herskowitz

Escherichia coli mutants blocked in lambda DNA synthesis

In: The Bacteriophage Lambda, ed. by A. D. Hershey

Cold Spring Harbor Laboratory, New York 553-564 (1971)

Graessmann, M.; A. Graessmann

"Early" simian-virus-40-specific RNA contains information for tumor antigen formation and chromatin replication

Proc. Natl. Acad. Sci. US 73, 366-370 (1976)

Gross, J. D.; D. Karamata; P. G. Hempstead

Temperature sensitive mutants of B. subtilis defective in DNA synthesis

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 307-312 (1968)

Hara, H.; H. Yoshikawa

Asymmetric bidirectional replication of Bacillus subtilis chromosome

Nature 244, 200-203 (1973)

Helmstetter, C. E.; S. Cooper; O. Pierucci; E. Revelas
On the bacterial life sequence
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 809-823 (1968)

Hershey, A. D.; M. Chase
Independent functions of viral protein and nucleic acid
in growth of bacteriophage
J. Gen. Physiol. 36, 39-56 (1952)

Hershey, A. D.; J. Dixon; M. Chase
Nucleic acid economy in bacteria infected with bacterio-
phage T2 I. Purine and pyrimidine composition
J. Gen. Physiol. 36, 777-789 (1953)

Hewitt, R.; J. C. Suit; D. Billen
Utilization of 5-bromouracil by thymineless bacteria
J. Bacteriol. 93, 86-89 (1967)

Hilliker, S.; D. Botstein
An early regulatory gene of Salmonella phage P22 analogous
to gene N of coliphage λ
Virology 68, 510-524 (1975)

Hohn, B.; M. Wurtz; B. Klein; A. Lustig; T. Hohn
Phage Lambda DNA packaging in vitro
J. Supramol. Struct. 2, 302-317 (1974)

Ikeda, H.; J. Tomizawa
Transducing fragments in generalized transduction by phage
P 1 I. Molecular origin of the fragments
J. Mol. Biol. 14, 85-109 (1965a)

Ikeda, H.; J. Tomizawa
Transducing fragments in generalized transduction by phage
P 1 III. Studies with small phage particles
J. Mol. Biol. 14, 120-129 (1965b)

Israel, V.
The production of inactive phage P22 particles following
induction
Virology 33, 317-322 (1967)

Israel, V.; T. F. Anderson; M. Levine

In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-plate parts

Proc. Natl. Acad. Sci. US 57, 284-291 (1967)

Israel, V.; M. Woodworth-Gutai; M. Levine

Inhibitory effect of bacteriophage P22 infection on host cell deoxyribonuclease activity

J. Virol. 2 752-757 (1972)

Iwatsuki, N.; R. Okazaki

Mechanism of regulation of deoxythymidine kinase of Escherichia coli

Effect of regulatory deoxynucleotides on the state of aggregation of the enzyme

J. Mol. Biol. 29, 139-154 (1967)

Jacob, F.; S. Brenner; F. Cuzin

On the regulation of DNA replication in bacteria

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 329-348 (1963)

St. Jeor, S. C.; T. B. Albrecht; F. D. Funk; F. Rapp

Stimulation of cellular DNA synthesis by human cytomegalovirus

J. Virol. 13, 353-362 (1974)

Kaiser, A. D.

Lambda DNA replication

In: The Bacteriophage Lambda, ed. by A. D. Hershey

Cold Spring Harbor Laboratory, New York 195-210 (1971)

Kaiser, D.; T. Masuda

In vitro assembly of bacteriophage Lambda heads

Proc. Natl. Acad. Sci. US 70, 260-264 (1973)

Kammen, H. O.

Thymine metabolism in Escherichia coli

I. Factors involved in utilization of exogenous thymine

Biochem. Biophys. Acta 134, 301-311 (1967)

Khandekar, P. S.; K. J. Ramanand

Incorporation of thymine and deoxythymidine into DNA of uninfected and bacteriophage P22 infected *Salmonella typhimurium*

Indian J. Biochem. Biophys. 9, 335-340 (1972)

Klein, A.; F. Bonhoeffer

DNA replication

Ann. Rev. Biochem. 41, 301-332 (1972)

Klemperer, H. G.; G. R. Haynes; W. J. H. Shedden; D. H. Watson

A virus-specific thymidine kinase in BHK 21 cells infected with herpes simplex virus

Virology 31, 120-128 (1967)

Koerner, J. F.

Enzymes of nucleic acid metabolism

Ann. Rev. Biochem. 39, 291-322 (1970)

Kornberg, A.

DNA synthesis

W. H. Freeman and Co., San Francisco , S. 226 ff. (1974)

Kozinski, A. W.; W. Szybalski

Dispersive transfer of the parental DNA molecule to the progeny of phage ϕ X-174

Virology 9, 260-274 (1959)

Kuempel, P. L.; P. Maglothlin; D.M. Prescott

Bidirectional termination of chromosome replication in *Escherichia coli*

Molec. Gen. Genet. 125, 1-8 (1973)

Lanka, E.; H. Schuster

Replication of bacteriophages in *Escherichia coli* mutants thermosensitive in DNA synthesis

Molec. Gen. Genet. 106, 274-285 (1970)

Lark, C.

Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*: dependence on growth rates

Biochim. Biophys. Acta 119, 517-525 (1966)

Levine, M.; C. Schott

Mutations of phage P22 affecting phage DNA synthesis and lysogenization

J. Mol. Biol. 62, 53-64 (1971)

Lin, S.-Y.; A. D. Riggs

Lac-operator analogues: bromodeoxyuridine substitution in the lac-operator affects the rate of dissociation of the lac repressor

Proc. Natl. Acad. Sci. US 69, 2574-2576 (1972)

Lindahl, G.; Y. Hirota; F. Jacob

On the process of cellular division in *Escherichia coli*: replication of the bacterial chromosome under control of prophage P2

Proc. Natl. Acad. Sci. US 68, 2407-2411 (1971)

Maaløe, O.; P. C. Hanawalt

Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle

J. Mol. Biol. 3, 144-155 (1961)

Manheimer, I.; N. Truffaut

Growth of bacteriophage ϕ X 174 in *Escherichia coli* strains temperature sensitive mutations for DNA initiation

Molec. Gen. Genet. 130, 21-27 (1974)

Martuscelli, J.; A. L. Taylor; D. J. Cummings; V. A. Chapman; S. S. De Long; L. Cañedo

Electron microscopic evidence for linear insertion of bacteriophage Mu 1 in lysogenic bacteria

J. Virol. 8, 551-563 (1971)

Meselson, M.; F. W. Stahl

The replication of DNA in *Escherichia coli*

Proc. Natl. Acad. Sci. US 44, 671-682 (1958)

Meselson, M.; J. J. Weigle

Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage

Proc. Natl. Acad. Sci. US 47, 857-868 (1961)

Morse, M. L.; E. M. Lederberg; J. Lederberg

Transduction in *Escherichia coli* K 12

Genetics 41, 142-156 (1956)

Mosig, G.; J. R. Carnighan; J. B. Bibring; R. Cole; H.-G. O. Bock; S. Bock

Coordinate variation in lengths of deoxyribonucleic acid molecules and head lengths in morphological variants of bacteriophage T4

J. Virol. 2, 857-871 (1972)

Nishimura, Y.; L. Caro; C. M. Berg; Y. Hirota

Chromosome replication in *Escherichia coli* IV. Control of chromosome replication and cell division by an integrated episome

J. Mol. Biol. 55, 441-456 (1971)

Nishioka, Y.; A. Eisenstark

Sequence of genes replicated in *Salmonella typhimurium* as examined by transduction techniques

J. Bacteriol. 102, 320- 333 (1970)

Okazaki, R.; A. Kornberg

Deoxythymidine kinase of *Escherichia coli*

I. Purification and some properties of the enzyme

II. Kinetics and feedback control

J. Biol. Chem. 239, 269-284 (1964)

Okubo, S.; M. Stodolsky; K. F. Bott; B. Straus

Separation of the transforming and viral deoxyribonucleic acids of a transducing bacteriophage of *Bacillus subtilis*

Proc. Natl. Acad. Sci. US 50, 679-686 (1963)

Ozeki, H.

Chromosome fragments participating in transduction in *Salmonella typhimurium*

Genetics 44, 457-470 (1959)

Ozeki, H.; H. Ikeda

Transduction mechanisms

Ann. Rev. Genet. 2, 245-278 (1968)

Raj, A. S.; A. Y. Raj; H. Schmieger

Phage genes involved in the formation of generalized transducing particles in Salmonella phage P22

Molec. Gen. Genet. 135 175-184 (1974)

Rosenberg, B. H.; L. F. Cavalieri; G. Ungers

The negative control mechanism for E. coli DNA replication

Biochemistry 63, 1410-1417 (1963)

Roth, J. R.; P. E. Hartman

Heterogeneity in P22 transducing particles

Virology 27, 297-307 (1965)

Sanderson, K. E.

Linkage map of Salmonella typhimurium Edition IV

Bacteriol. Rev. 36, 558-586 (1972)

Schekman, R.; W. Wickner; O. Westergaard; D. Brutlag;

K. Geider; L. L. Bertsch; A. Kornberg

Initiation of DNA synthesis: Synthesis of ϕ X 174 replicative form requires RNA synthesis resistant to rifampicin

Proc. Natl. Acad. Sci. US 69, 2691-2695 (1972)

Schekman, R.; A. Weiner; A. Kornberg

Multienzyme systems of DNA replication

Science 186, 987-993 (1974)

Schildkraut, C. L.; J. Marmur; P. Doty

Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl

J. Mol. Biol. 4, 430-443 (1962)

Schmieger, H.

Die molekulare Struktur transduzierender Partikel beim Salmonella-Phagen P22

I. Dichtegradienten-Untersuchungen an intakten Phagen

Molec. Gen. Genet. 102 336-347 (1968)

Schmieger, H.

The molecular structure of the transducing particles of Salmonella phage P22.

II. Density gradient analysis of DNA

Molec. Gen. Genet. 109, 323-337 (1970)

Schmieger, H.

The fate of the bacterial chromosome in P22-infected cells of Salmonella typhimurium

Molec. Gen. Genet. 110, 238-244 (1971a)

Schmieger, H.

A method for detection of phage mutants with altered transducing ability

Molec. Gen. Genet. 110, 378-381 (1971b)

Schmieger, H.

Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities

Molec. Gen. Genet. 119, 75-88 (1972)

Schmieger, H.; U. Buch

Appearance of transducing particles and the fate of host DNA after infection of Salmonella typhimurium with P22-mutants with increased transducing ability (HT-mutants)

Molec. Gen. Genet. 140, 111-122 (1975)

Schmieger, H.; H. Backhaus

Altered cotransduction frequencies exhibited by HT-mutants of Salmonella-phage P22

Molec. Gen. Genet. 143, 307-309 (1976)

Schnös, M.; R. Inman

Position of branch points in replicating λ DNA

J. Mol. Biol. 51, 61-73 (1970)

Schroeder, W.; E. G. Bade; H. Delius

Participation of Escherichia coli DNA in the replication of temperate bacteriophage Mu 1

Virology 60, 534-542 (1974)

Schwarz, W.

Isolierung von dna_{ts} -Mutanten bei *Salmonella typhimurium*
Diplomarbeit, Techn. Univ. München (1975)

Schweiger, M.; P. Herrlich

Renaissance des Bacteriophagen

Naturw. Rundsch. 28, 395-402 (1975)

Shannon, K. P.; R. J. Rowbury

Alternation in the rate of cell division independent of the
rate of DNA synthesis in a mutant of *Salmonella typhimurium*
Molec. Gen. Genet. 115, 122-125 (1972)

Shapiro, B. M.; A. G. Siccardi; Y. Hirota; F. Jacob

On the process of cellular division in *Escherichia coli*

II. Membrane protein alterations associated with mutations
affecting the initiation of DNA synthesis

J. Mol. Biol. 52, 75-89 (1970)

Sheppard, D. E.

Density gradient centrifugation of bacteriophage P22

Virology 17 212-214 (1962)

Skalka, A.; P. Hanson

Comparisons of the distribution of nucleotides and common
sequences in deoxyribonucleic acid from selected bacterio-
phages

J. Virol. 2, 583-593 (1972)

Smith, H. O.; M. Levine

Two sequential repressions of DNA synthesis in the estab-
lishment of lysogeny by phage P22 and its mutants

Proc. Natl. Acad. Sci. US 52, 356-363 (1964)

Smith, H. O.; M. Levine

The synthesis of phage and host DNA in the establishment
of lysogeny

Virology 25, 585-590 (1965)

Smith, H. O.; M. Levine

Gene order in prophage P22

Virology 27, 229-231 (1965b)

Sompayrac, L.; O. Maaløe

Autorepressor model for control of DNA replication

Nature 241, 133-135 (1973)

Spratt, B. G.; R. J. Rowbury

A mutant in the initiation of DNA synthesis in *Salmonella typhimurium*

J. Gen. Microbiol. 64, 127-138 (1970)

Stahl, F. W.; J. M. Crasemann; L. Okun; E. Fox; C. Laird

Radiation-sensitivity of bacteriophage containing 5-bromodeoxyuridine

Virology 13, 98-104 (1961)

Starlinger, P.

Über einen Defekt des transduzierenden *Salmonella*-Phagen P22

Z. Naturforsch. 13b, 489-493 (1958)

Starlinger, P.

Zur Herkunft des in der Transduktion durch den Phagen P22 übertragenen Materials

Z. Naturforsch. 14b, 523-528 (1959)

Stevens, W. F.; S. Adhya; W. Szybalski

Origin and bidirectional orientation of DNA replication in coliphage lambda

In: The Bacteriophage Lambda, ed. by A. D. Hershey

Cold Spring Harbor Laboratory, New York 515-533 (1971)

Stocker, B. A. D.

Phage mediated transduction

In: Recent progress in microbiology

Almquist & Wicksell, Stockholm 31-39 (1958)

Streisinger, G.; J. Emrich; M. M. Stahl

Chromosome structure in phage T4

III. Terminal redundancy and length determination

Proc. Natl. Acad. Sci. US 57, 292-295 (1967)

Taylor, J. H. ed.

Selected papers on molecular genetics

Academic press (New York and London) (1965)

Thouless, M. E.; K. C. Chachda; W. H. Munyon

Serological specificity of thymidine kinase activity in
herpes simplex virus transformed L cells

Virology 69, 350-351 (1976)

Toussaint, A.; M. Faelen

The dependence of temperate phage Mu 1 upon replication
functions of E. coli K 12

Molec. Gen. Genet. 131, 209-214 (1974)

Tye, B.-K.

A mutant of phage P22 with randomly permuted DNA

J. Mol. Biol. 100, 421-426 (1976)

Tye, B.-K.; J. A. Huberman; D. Botstein

Non-random circular permutation of phage P22 DNA

J. Mol. Biol. 85, 501-527 (1974)

Uetake, H.; S. E. Luria; J. W. Burrous

Conversion of somatic antigens in Salmonella by phage infection leading to lysis or lysogeny

Virology 5, 68-91 (1958)

Vinograd, J.

Sedimentation Equilibrium in a buoyant density gradient

In: Methods in Enzymology, ed. by S. P. Colowick and
N. O. Kaplan

Academic press, New York & London, 854-870 (1963)

Wada, C.; T. Yura

Phenetyl alcohol resistance in Escherichia coli

III. A temperature sensitive mutation (dna P) affecting
DNA replication

Genetics 77, 199-220 (1974)

Wechsler, J. A.; J. D. Gross

Escherichia coli mutants temperature sensitive for DNA
synthesis

Molec. Gen. Genet. 113, 273-284 (1971)

Whitfield, H. J.; G. Levine

Isolation and characterization of a mutant of *Salmonella typhimurium* deficient in a major deoxyribonucleic acid polymerase activity

J. Bacteriol. 116, 54-58 (1973)

Wickner, S.; J. Hurwitz

Conversion of ϕ X174 viral DNA to doublestranded form by purified *Escherichia coli* proteins

Proc. Natl. Acad. Sci. US 71, 4120-4124 (1974)

Wittmann, H. G.

Proteinuntersuchungen an Mutanten des Tabakmosaikvirus als Beitrag zum Problem des genetischen Codes

Z. Vererbungsbl. 93, 491-530 (1962)

Woodworth-Gutai, M.; V. Israel; M. Levine

New deoxyribonuclease activity after bacteriophage P22 infection

J. Virol. 9, 746-751 (1972)

Yamagami, H.; N. Yamamoto

Contribution of the bacterial recombination function to replication of bacteriophage P22

J. Mol. Biol. 53, 281-285 (1970)

Yamagishi, H.

Nucleotide distribution in the DNA of *Escherichia coli*

J. Mol. Biol. 49, 603-608 (1970)

Yamagishi, H.

Distribution of nucleotides in *Escherichia coli* DNA from ϕ 80 transducing bacteriophage

J. Mol. Biol. 58, 405-416 (1971)

Yarmolinsky, M. B.

Some genetic controls on the replication and segregation of temperate coliphages

Genetics 79, 229-245 (1975)

Zinder, N. D.

Bacterial transduction

J. Cell. Comp. Physiol. 45 (Suppl. 2) 23-49 (1955)

Zinder, N. D.; J. Lederberg

Genetic exchange in Salmonella

J. Bacteriol. 64, 679-699 (1952)

F. Z U S A M M E N F A S S U N G

I. In Lysaten des Salmonella-Phagen P22 gibt es einen kleinen Anteil transduzierender Partikel (t.P.), deren DNS nach Infektionszeitpunkt repliziert wurde. Die Untersuchung dieser Partikel wird mit Lysaten der Phagenmutante HT 12/4 möglich, welche eine besonders hohe Anzahl an t.P. bildet. Wenn die nach Infektion synthetisierte DNS in T-BU-Lysaten dieser Mutante durch Bromdesoxyuridin dichtemarkiert wird, lassen sich in CsCl-Gradienten neben der Hauptgruppe noch zwei diskrete Gruppen "schwerer" und "superschwerer" t.P. nachweisen. Alle t.P. enthalten den gleichen Anteil bakterieller Information. Die Hypothese, daß diese Partikelgruppen nach Infektionszeitpunkt semikonservativ replizierte bakterielle DNS enthalten, wird durch eine Dichtegradientenanalyse der DNS der "schweren t.P." bestätigt (Backhaus und Schmieger, 1974).⁺)

II. a) Diese DNS kann nicht das Produkt einer nach Phageninfektion fortgesetzten bakteriellen Chromosomenreplikation sein. Es läßt sich nachweisen, daß während der normalen bakteriellen DNS-Synthese Bromuracil mit erheblich geringerer Effizienz in die DNS eingebaut wird, als nach dem Zeitpunkt der Infektion in die Phagen-DNS der i.P. und die Bakterien-DNS der Gruppen "schwerer" und "superschwerer" t.P.

⁺) Die experimentellen Ergebnisse der Abschnitte I. und II.a wurden bereits veröffentlicht: Backhaus, H.; H. Schmieger The origin of the DNA in a special class of generalized transducing particles of Salmonella-phage P22. Molec. Gen. Genet. 131, 123-135 (1974)

b) Mit Hilfe einer Bakterienmutante (TB 37), die einen temperatursensiblen Defekt in der Initiation der DNS-Replikation besitzt, sind Versuche möglich, bei denen zum Zeitpunkt der Phageninfektion keine bakterielle DNS-Synthese abläuft.

1. Dann zeigen Kurzzeitmarkierungs-Experimente mit ^3H -Thymin, daß unter diesen Bedingungen die Phagen-kontrollierte DNS-Synthese ohne Verzögerung nach der Infektion einsetzt und normal abläuft.

2. Wenn durch eine kurze Zeit in der permissiven Temperatur von 34°C das Ablaufen eines späten - bei P22 normalerweise temperatursensiblen - Schrittes der Morphopoese gestattet wird, läßt sich demonstrieren, daß die Partikelreifung von dem in der Mutante TB 37 bei der höheren Temperatur defekten Protein unabhängig ist.

c) In der Mutante TB 37 können T-BU-Lysate bei 42°C gezogen werden, deren dichtemarkierte DNS einwandfrei das Produkt einer Phagen-kontrollierten DNS-Replikation ist. In solchen Lysaten läßt sich dann der gleiche Anteil "schwerer" und "superschwerer" t.P. nachweisen, wie in Lysaten, die in der für die bakterielle Replikation permissiven Temperatur vermehrt wurden. Die neureplizierte bakterielle DNS stammt in vergleichbarer Häufigkeit aus verschiedenen Bereichen des Bakterienchromosoms. Das zeigt, daß die Initiation der Phagen-kontrollierten Replikation bakterieller DNS nicht an einen eindeutig bestimmten Origin auf dem Bakterienchromosom gebunden ist. Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, nach denen ein solcher Vorgang ablaufen kann.

Nach Abschluß dieser Arbeit möchte ich allen danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Horst Schmieger für die Anregung, Beratung und stetige Diskussionsbereitschaft.

Lebenslauf:

Ich wurde am 29. April 1941 in Berlin geboren. Meine Eltern sind Rudolf Backhaus und Garda Backhaus, geborene Dehnke. Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Peine bei Hannover, anschließend bis 1960 den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des dortigen Ratsgymnasiums. Im März 1960 erhielt ich das Zeugnis der Reife. Dann war ich Zeitsoldat in der Luftwaffe, die ich 1966 als Oberleutnant verließ. Von 1966 bis 1971 studierte ich Biologie, Chemie und Mikrobiologie in Göttingen, wo ich im Oktober 1971 die mündliche Diplomprüfung ablegte und im Juli 1972 meine Diplomarbeit in der Abteilung für molekulare Genetik im Institut für Mikrobiologie abschloß. Ab August 1972 arbeitete ich am Genetischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Horst Schmieger an der vorliegenden Arbeit. Seit Mai 1974 verwalte ich die Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten.

